

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. H. Graul)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität Marburg/Lahn
(Direktoren: Prof. Dr. Dr. E. H. Graul und Prof. Dr. F. Heß)

Radioimmunchemische Digoxinbestimmung im Serum

Pharmakokinetische und klinische Bedeutung, Problematik,
Methodik, Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen RIA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

Liane Müller
aus Berlin

Marburg 1976

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
(Direktor: Prof.Dr.Dr.E.H.Graul)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität Marburg/Lahn
(Direktoren: Prof.Dr.Dr.E.H.Graul und Prof.Dr.F.Heß)

R a d i o i m m u n c h e m i s c h e D i g o x i n -
b e s t i m m u n g i m S e r u m

Pharmakokinetische und klinische Bedeutung, Problematik,
Methodik, Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen RIA

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

L i a n e M ü l l e r
aus Berlin

Marburg 1976



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 23.1.1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof.Dr.H.Oepen

Referent: Prof.Dr.Dr.E.H.Graul

Correferent: Doz.Dr.H.Müller

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.1.	Struktur der Cardenolide	3
2.2.	Struktur-Wirkungsbeziehungen der Cardenolide	7
2.3.	Anforderungen an ein ideales Cardenolid	11
3.1.	Grundzüge der Pharmakokinetik von Digitalis	12
3.2.	Pharmakokinetische Daten des Digoxins	23
3.3.	Pharmakokinetische Daten des Acetyldigoxins	28
3.4.	Pharmakokinetische Daten des β -Methyldigoxins	29
4.1.	Relevanz der Serumdigoxinkonzentration	30
4.2.	Hyperdigoxinämie und Digoxinintoxikation	36
4.3.	Hypodigoxinämie	39
4.4.	Korrelation von Serumdigoxinspiegel und Myokardkonzentration	43
4.5.	Serumdigoxinspiegel und Myokardtoleranz	49
4.6.	Serumdigoxinspiegel und Stoffwechsellage	53
4.7.	Serumdigoxinspiegel und Niereninsuffizienz	56
5.	Digitalisrezeptor	61
6.1.	Digitalisbestimmungsmethoden	68
6.2.	Prinzip des RIA	80
6.3.	RIA zur Digitalisbestimmung	86
7.1.	Eigene Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Digoxin-RIA	87
7.2.	RIA mit fixiertem Antikörper	109
8.	Biologische Verfügbarkeit von Digoxin	110
9.	Statistische Auswertung	120
10.	Zusammenfassung	122
11.	Literaturverzeichnis	124
12.	Anhang (Abbildungen und Tabellen)	I

Die Numerierungen in arabischen Zahlen für Abbildungen und Tabellen beziehen sich auf den Textteil, in römischen Zahlen auf den Anhang.

1. Einleitung

Digitalisglykoside sind seit Jahrzehnten ein fester Bestandteil im Arzneyschatz zur wirkungsvollen Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. Ihre Wirksamkeit ist mit dem Skalpell des Chirurgen verglichen worden. Die Dosierung richtet sich wie bei allen Medikamenten primär nach empirischen Richtwerten und nach dem Behandlungserfolg, also nach klinischen Parametern. Bei der nachteilig geringen therapeutischen Breite, den interindividuellen Unterschieden in der Pharmakokinetik und Glykosidtoleranz sind Überdosierungen fast unvermeidlich, wenn in bestimmten Situationen die volle Wirksamkeit ausgeschöpft werden muß (163). Die Abschätzung der Erhaltungsdosis z.B. für Digoxin kann für den Einzelfall trotz Nomogrammen (Abb. 24 und 25) schwierig werden bei Niereninsuffizienz (52,188), bei Störungen des Elektrolythaushaltes (86, 455), bei Resorptionsstörungen wie dem Malabsorptionssyndrom (168, 207) und bei Medikamentinterferenzen wie mit Neomycin (288). Betagte Patienten tendieren zu Digitalisretentionen wegen des im Alter kleineren Glomerulumfiltrates (25, 88, 143). Bei bereits mit Digitalis anbehandelten Patienten mit Rhythmusstörungen ist bei einer Erstkonsultation oft die Frage schwierig zu beantworten, ob die Störungen Folge eines erhöhten Digitalispiegels oder primär myokardial bedingt sind; das Ekg kann gerade unter Digitalis vieldeutig sein und die Differenzierung nicht erleichtern (384).

Wenn auch - besonders nach amerikanischen Erhebungen - die Digitalisintoxikationsquote bis zu 22% betragen kann (25,360,409), so ist das Pendant, eine Digitalisunterdosierung mit entsprechend unausgeschöpfter Therapiechance, noch eine Dunkelziffer. Die Vergeßlichkeit alter Patienten bezüglich einer regelmäßigen Tabletteneinnahme und die Furcht des behandelnden Arztes vor einer unkontrollierten Überdosierung dürften die häufigsten Ursachen für eine Unterdosierung sein.

In den letzten Jahren konnten Methoden zur Konzentrationsbestimmung vor allem von Digoxin und Digitoxin im Serum entwickelt werden. Besonders für kritische Situationen und für die Überwachung von Problemfällen ist zu den klinischen Parametern ein Laborparameter hinzugekommen, der eine hohe Verlässlichkeitsgarantie vorausgesetzt - dem behandelnden Arzt mehr Sicherheit bei der Digitalisierung geben könnte. Eine bessere Anpassung der Dosis an den Einzelfall dürfte dadurch möglich sein; bei longitudinalen Kontrollen könnten Tendenzen der Über- oder Unterdosierung frühzeitig erkannt und die Dosis entsprechend korrigiert werden. Nach ersten Mitteilungen konnte unter konsequenter Berücksichtigung der Serumkonzentration für die Digitalisverordnung die Häufigkeit der Intoxikationen von 13,9 auf 5,9%, also um gut die Hälfte, gesenkt werden (245). Wegen der Überlappung von therapeutischen und toxischen Serumkonzentrationen (77, 139) und der individuell unterschiedlichen Digitalistoleranz (47) hat allerdings eine Einzelbestimmung nur eine beschränkte Aussagekraft; erst der Vergleich mit früheren Werten erlaubt in Synopsis mit der klinischen Symptomatik eine Beurteilung der aktuellen Situation (139).

Stellungnahmen von Klinikern mögen die Bedeutung der Serumdigitalisbestimmung weiter unterstreichen:

Grosse-Brockhoff: "Durch die Möglichkeit, Digitalisglykoside (Digoxin und Digitoxin) radioimmunologisch oder mit Hilfe der ⁸⁶Rubidium-Methode quantitativ im Blutserum zu bestimmen, ist das Problem einer optimalen Digitalistherapie unter verschiedenen krankhaften Bedingungen erneut aktuell geworden" (188). "Die bisherigen Dosierungsrichtlinien für Herzglykoside stützen sich auf klinische Kenntnisse der Absorptionsquote, der Vollwirkdosis und der Abklingquoten. Sie sind durch die Bestimmung der Serumglykosidspiegel wesentlich ergänzt worden" (354).

Chamberlain: "I would like to emphasize that plasma concentrations should never be the sole arbiter of dosage, but should always be considered in the full clinical context" (79).

Doherty: "Serum levels of digoxin appear to be directly related to myocardial concentration of the drug and have been increasingly useful during the past several years. There is , however, general agreement that the serum digoxin level is a useful tool in the management of patients who require the drug" (124).

Smith: "Increasing availability of serum or plasma digitalis concentration measurements thus offers the clinician a potential means of improving the patient's chances of benefiting from treatment with cardiac glycosides" (404).
"Despite statistically significant differences in mean levels, however, overlap has been observed in most series, and it should be emphasized that no single concentration can be chosen that clearly distinguishes between toxic and non-toxic serum digoxin levels. Serum concentration data are most useful when interpreted together with all other clinically relevant variables" (407).

Beller: "It seems that the real problem in digitalis therapy no longer is restricted to toxicity alone. Probably it is as important to correct under-digitalization. Also in this respect the access to determination of the serum levels of digitalis has opened a new era in medicine" (25).

In der vorliegenden Schrift wird aufgrund von Paralleluntersuchungen mit 5 verschiedenen Radioimmunoassays (RIA) zur Digoxinbestimmung im Patientenserum zu methodischen Fragen wie Vergleichbarkeit, Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Meßwerte sowie zur Spezifität und zu Fehlermöglichkeiten des RIA Stellung genommen.

2.1 Struktur der Cardenolide

Im Kulturkalender der Menschheit sind Wirkung und Anwendung einiger uns heute als herzwirksam aus dem Tier- und Pflanzenreich klassifizierter Steroide bereits vor über 3.500 Jahren dokumentiert (115). Der älteste Bericht findet sich im

chinesischen Schrifttum, aus dem hervorgeht, daß die zu einem Pulver - Chan Su - zerriebene Krötenhaut als Mittel gegen Wassersucht verwendet wurde (255). Die im Mittelmeerraum heimische Meerzwiebel - *Scilla maritima* - hatte in Ägypten während der Pharaonendynastien dieselbe therapeutische Indikation, wie im Eberschen Papyrus vor ca. 1.500 a.Chr.n. vermerkt ist. Vor 190 Jahren veröffentlichte Withering (471) den ersten medizinisch-kasuistischen Erfahrungsbereich über die diuretischen und auch pulsfrequenzsenkenden Eigenschaften des roten Fingerhutes, dessen Blätter er von einer Kräuterfrau aus der englischen Grafschaft Shropshire bezog. Die eigentliche Herzwirkung der *Digitalis purpurea* erkannte einige Jahre später - 1799 - Ferriar. 1874 bezeichnete Schmiedeberg den Wirkstoff der *Digitalis purpurea* als Digitoxin, das 1896 von Nativelle als genuines Glykosid in kristalliner Form isoliert werden konnte. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte hat die organische Chemie dank schonender Analysetechniken mehr als 200 der in der Natur vorkommenden herzwirksamen Digitalisstoffe aufgefunden (371), von denen jedoch nur einige therapeutische Anwendung fanden. Die Struktur dieser Stoffklasse konnte ebenso aufgeklärt werden wie ihre Biosynthese in der Pflanze (83 , 84 , 85 , 363, 433). Aus Essigsäure und Mevalonsäure wird Cholesterin aufgebaut, das für die weitere Synthese der Steroide eine Schlüsselstellung einnimmt (186, 279, 358). Steroide zählen zu den Lipiden, weil sie überwiegend hydrophob sind und aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert werden (358). Digitalissteroide sind Glykoside und zerfallen durch anorganische Säurehydrolyse in einen Zucker- und Geninanteil - auch Aglykon oder Cardenolid genannt (194). Cardenolide sind Phytosteroide, während Bufadienolide im tierischen Organismus - z.B. von Kröten - gebildet werden. Bufadienolide unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur von Cardenoliden durch einen 6-gliedrigen Lactonring sowie durch Ester- anstatt Glykosidbindung (255). Auf das Genin ist hauptsächlich die Herzwirkung zurückzuführen. Die Genine gehören zur Klasse der Steroide und ent-

halten als solche das Steroidgerüst mit 4 kondensierten Ringen, die fast immer hydriert sind zum Cyclopentanoperhydrophenanthren (Abb. 1) (nur wenige Verbindungen besitzen wie das Cholesterin eine Doppelbindung zwischen den Ringen A und B). Über das C₁₇-Atom ist noch ein weiterer Ring in Form eines ungesättigten 5-gliedrigen Lactonringes angefügt. Die einzelnen Ringe sind nicht in einer Ebene, sondern sterisch miteinander verknüpft und in sich räumlich gefaltet zur energiearmen Sesselform. Diese Konformation ist eine *conditio sine qua non* für die kardiale Wirksamkeit. Der Begriff Cardenolid kennzeichnet bereits eine Zuordnung der Ringe A und B, C und D in cis-, der Ringe B und C in trans- und des Ringes E in β -Stellung. Analog nehmen auch die Substituenten eine räumliche Stellung zur Steroidkonfiguration ein; sie stehen überwiegend in β -Stellung, so z.B. die CH₃- und OH-Gruppen sowie die Zuckerkette für Digitoxigenin und Digoxigenin.

Steran (=Cyclopentanoperhydrophenanthren)

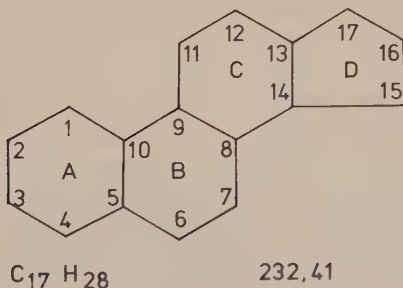


Abb. 1: Grundgerüst der Cardenolide, bestehend aus den 4 Ringen A, B, C, D, von denen der letzte ein 5-gliedriger ist. Am C₁₇-Atom wird der Laktoneering und am C₃-Atom die Zuckerkette gebunden.

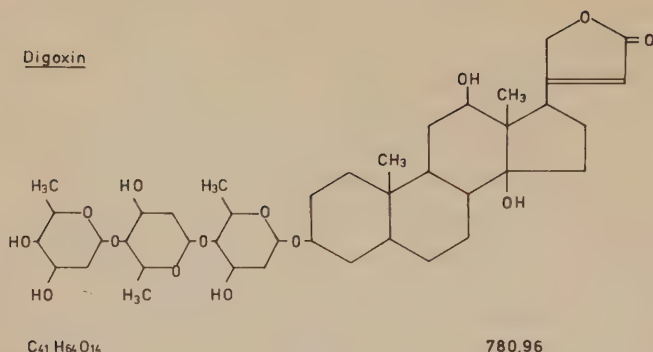


Abb. 2: Struktur und Summenformel sowie Molekulargewicht von Digoxin.

Der Zuckeranteil der Digitalis-Cardenolide besteht meistens aus 3 Mol D-Digitoxose wie beim Digitoxin und Digoxin (Abb.2); selten kommt auch 1 Mol D-Glukose vor wie beim Lanatosid C. Die Pflanze bildet D-Digitoxose als sogen. Desoxyzucker aus D-Glukose durch Reduktion von 2 OH-Gruppen. Seltener werden glykosidische Bindungen mit L-Zuckern wie mit der L-Oleandrose und L-Rhamnose, z.B. im g-Strophanthin, eingegangen.

Die Vollsynthese dieser Stoffe ist auch *in vitro* möglich (97, 136, 194), wodurch die Palette von Glykosiden noch durch eine Vielzahl von Verbindungen erweitert werden kann, die primär in der Natur nicht vorkommen. Eine industrielle Produktion ist wegen zu geringer Ausbeute und zu vieler Syntheseschritte nicht angelaufen.

Für wissenschaftliche Fragestellungen und für die Grundlagenforschung wurden Substitutionen - insbesondere von OH-, Methyl- und Acetyl-Gruppen - an verschiedenen C-Atomen des Cardenolidgerüsts oder an Zuckermolekülen der D- oder L-Reihe in α - oder β -Glykosidbindung vorgenommen. Die substituierten Verbindungen zeigten gegenüber der Ausgangssubstanz Unterschiede in der Herzwirksamkeit und/oder Resorbierbarkeit. Neuartige synthetische Substanzen mit digitalisartiger Wirkung konnten vor ca. 10 Jahren dadurch gewonnen werden, indem 2 Guanylhydrazongruppen mit Ketosteroiden wie Prednison,

Prednisolon, Cortison, Hydrocortison u.a. verbunden wurden (126,253,381) (Abb.III). Diese interessanten, in der Natur nicht vorkommenden Verbindungen werden als Bisguanylhydrazone (BGH) bezeichnet.

2.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen der Cardenolide

Die systematische tierexperimentelle Testung einer Vielzahl von Cardenoliden, ihrer Glykoside und substituierten Derivate ließ bestimmte Struktur-Wirkungsbeziehungen erkennen, die jedoch quantitative Speciesunterschiede bei Hund, Katze, Meer-schweinchen, Ratte und Mensch aufwiesen. Grundsätzlich gilt, daß Konstitution und Konformation des Genins die inotrope Wirkung bestimmen (13,63,443). Der kardiotope Effekt wird durch die Zuckerkette verstärkt.

Im Gegensatz zu früheren Auffassungen steht heute fest, daß prinzipiell keine qualitativen, sondern nur quantitative Unterschiede in der Herzwirkung der verschiedenen Cardenolide und ihrer Glykoside bestehen, die aus der verschiedenen großen Verweildauer der Herzsteroiden im Organismus resultieren und die die Basis bilden für den klinischen Begriff der Kumulation (171,187,261,388,428,457). Die für die Therapie entscheidende Eigenschaft aller Glykoside ist ihre gemeinsame positiv inotrope Wirkung, d.h. die Steigerung der Kontraktionskraft mit Verkürzung der Austreibungszeit ohne Frequenzsteigerung und ohne wesentliche Beeinflussung des Sauerstoffbedarfs (282,388,461).

Repke und Mitarbeiter (213,365,370,371) fanden keine Organspezifität für Digitalis - weder hinsichtlich einer spezifischen Substratakkumulation im Myokard noch bezüglich einer speziellen Sensitivität eines Organs für Cardenolide. Aufgrund neuerer Untersuchungen vermuten Haberland (194) und Benthe (35) jedoch eine längere Haftung von z.B. Digoxin am Myokard und erklären damit die Diskrepanz zwischen der Eliminations- $t/2$ und der klinischen Wirkungsdauer. Der Digitaliseffekt entfaltet sich vorzugsweise am Muskel- und Nervensystem, d.h. an den erregbaren Geweben (371),

obwohl im Vergleich zu anderen Organen der Enzymrezeptor des Herzens keine höhere Empfindlichkeit aufweist. Repke (371) vergleicht diese Pseudo-Herzspezifität der Cardenolide mit einem "Enghalsprozess" im Kationentransport, da die zwischen den einzelnen Kontraktionen aufzubringende Ionenverschiebung im Grenzbereich der Transportkapazität des Myokards liegt. Wegen dieses engen Spielraums prägt sich daher der Hemmeffekt auf den $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Ca}^{++}$ -Transport des Herzens wirksamer aus als an anderen Organen, bei denen größere Kapazitätsverhältnisse vorliegen.

Die therapeutische Breite, d.h. das Verhältnis zwischen therapeutisch effektiver und toxischer Dosis, ist bei allen Herzglykosiden klein; für Digoxin und Digitoxin beträgt beispielsweise die therapeutische Dosis 50-60% der toxischen (371) (Abb. 3). Unter diesem Aspekt könnten Cardenolide auch als Herzgifte bezeichnet werden (286).

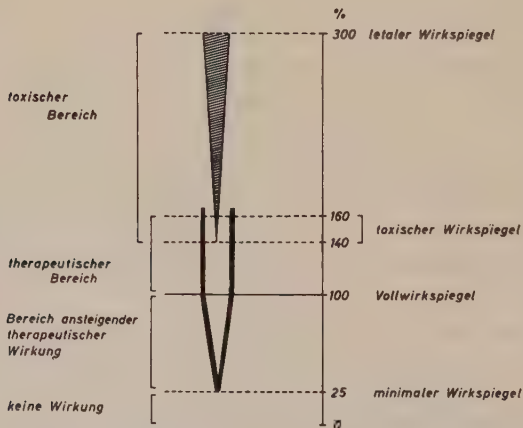


Abb. 3: Dosis-Effektbeziehung der Digitalisglykoside aus klinischer Sicht. Der toxische Digitalisspiegel ist nur etwa um die Hälfte größer als der Vollwirkspiegel - jener Glykosidmenge im Organismus, die für den angestrebten vollen therapeutischen Effekt notwendig ist.

(Entnommen: Haan, D. und H.Kreuzer (191)).

Als bemerkenswertes Forschungsergebnis der letzten Jahre ist die Verbesserung der enteralen Resorption von Herzglykosiden durch Acetylierung und Methylierung z.B. der endständigen Digitoxose des Digoxins zu verbuchen, durch die eine größere Lipophilie erreicht worden ist. Seit der 2. Hälfte des vergangenen Jahrzehnts steht für die Behandlung der Herzinsuffizienz das β -Acetyldigoxin (Abb. I) und seit wenigen Jahren das β -Methyldigoxin (Abb. II) zur Verfügung. Die Einfügung von OH-Gruppen kann die biologische Wirksamkeit - gemessen an der LD_{50} in mg/kg - steigern, wie OH-Substitutionen an den C-Atomen 11, 12 und 19 des Digitoxigenins bestätigt haben (84, 208, 209). Andererseits verursachen OH-Substitutionen an anderen C-Atomen des Steroidgerüsts, z.B. an C_{1,5,7,15,16,17}, eine Wirkungsabschwächung (13, 57, 208, 238, 248, 372). Am Beispiel der OH-Substitution erweist sich sehr deutlich das bereits von den Steroidhormonen der Nebenniere und der Isomerie der Enzyme her bekannte Phänomen der Struktur-Wirkungsbeziehung; nicht nur der Substituent an sich, sondern vielmehr seine stereometrische Position bedingt die biologische Wirkung.

Ebenso wie die Hydroxylierung kann eine Veresterung von OH-Gruppen die kardiale Wirkung verstärken oder abschwächen. Durch Acetylierung kann z.B. der inotrope Effekt von Digitoxigenin vermindert, der von Gitoxigenin intensiviert werden (208, 209).

An der Zuckerkette führen Änderungen ihrer sterischen Anordnung oder Austausch des L- gegen das D-Isomer einheitlich zu einer Reduktion der inotropen Effektivität (208, 478, 479). Die in C₃ stehende OH-Gruppe ist von wesentlicher Bedeutung für die pharmakodynamische Wirkung des Genins. Bei Änderung ihrer sterischen Position oder bei Dehydrierung zur Keto-Gruppe erlischt der kardiotone Effekt.

Eine Achillesferse der Cardenolide stellt die OH-Gruppe in C₁₄ dar. Diese unterliegt leicht einer Säurehydrolyse mit Auftreten einer Doppelbindung oder Lageänderung des Pentanringes, wodurch die inotrope Wirkung vollständig aufgehoben wird (63); das gleiche gilt für die Abspaltung der C₁₆-ständigen OH-Gruppe.

Der Lactonring ist von besonderer Bedeutung für die kardiale Wirkung der Cardenolide (371). Allein die sterische Transformation in die 17 α -Position hebt vollständig die Wirkung auf. Die Hydrierung der Doppelbindung des Lactonringes zu Dihydroderivaten schwächt die Wirkung sowohl am intakten Tier als auch am Herz-Lungen-Präparat und am isolierten Herzmuskel erheblich ab (10,63,82,371). Das Vorkommen solcher Dihydroderivate als Metabolite wird auch in vivo vermutet (371). Interessant ist an diesen hydrierten Cardenoliden ihre größere therapeutische Breite (448), deren Ursache Repke (371) - übereinstimmend mit anderen Untersuchern (476) - ohne erkennbare metabolische Unterschiede in einer geringeren Assoziation am spezifischen Rezeptor und in einer besseren Penetration durch die Zellmembran sieht. In der Kardiologie haben sich Dihydroderivate wegen ihrer zu flüchtigen Wirkung nicht bewährt (372).

In die Herztherapie sind Aglykone nicht eingeführt worden, obwohl sie am isolierten Herzmuskel kardiotope Effekte hervorrufen. Die Ursache für ihre therapeutische Unbrauchbarkeit liegt in der schnellen Umsetzung im Organismus zu unwirksamen Metaboliten. Allein die Zuckerkette in den Glykosiden sichert ihre therapeutische Verwendbarkeit. Diese Zuckerkette, die interessanterweise im Pflanzenreich nicht gespalten werden kann, verzögert im Tierorganismus den Metabolismus - Hydroxylierung, stufenweiser Zuckerabbau, Umlagerung - wofür besonders das Digitoxin mit seinen 3 Mol D-Digitoxose ein Beispiel ist (366,442,472). Ebenso wie die Aglykone und Dihydrocardenolide fanden auch die synthetischen Bisguanylhydrazone der Ketosteroide (BGH) keinen Eingang in die Therapie, weil sich ihre Wirkung in der klinischen Erprobung - vor allem in der Langzeitverordnung - als zu schwach erwiesen hat (172,425), obgleich ouabain-ähnliche Effekte tierexperimentell sowohl am isolierten als auch am in situ belassenen und akut insuffizient gemachten Meerschweinchenherzen nachweisbar waren (126,172,173,174,199) - allerdings waren diese Effekte nur von kurzer Dauer. Für BGH wurde außerdem eine zytostatische Wirkung diskutiert (372).

2.3 Anforderungen an ein ideales Cardenolid

Nach Repke (371) ist bei kritischer Betrachtung die Digitalisforschung trotz besserer Kenntnis der Biochemie, der Pharmakokinetik und des Metabolismus für eine Reihe von Cardenoliden und Steigerung ihrer enteralen Resorption dennoch nicht wesentlich über den therapeutischen Stand Witherings hinausgekommen. Das Kardinalproblem der schmalen therapeutischen Breite ist geblieben.

Ein ideales Herzglykosid mit guter enteraler Resorption bzw. enteraler oder oraler Wirksamkeit (372) hat 3 Kriterien zu erfüllen:

1. Wasserlöslichkeit (322,368). Eine schnelle Lösung im Darmsaft ist eine Vorbedingung für eine effektive Resorption. Z.B. Gitoxin, eines der Hauptglykoside der *Digitalis purpurea*, ist bei oraler Verabreichung unwirksam, weil es weder wasser- noch lipidlöslich ist.
2. Lipidlöslichkeit (321,322,368). Diese ist Voraussetzung für die Überwindung der lipoiden Grenzbarriere des Darmtraktes. Mit steigender Lipidlöslichkeit (fallender Polarität) nimmt die Penetration durch die Mukosa zu und die Elimination über Harn und Galle pro Zeit ab. Eine gute Resorbierbarkeit setzt ein Minimum von Hydroxylgruppen voraus (194). Die Höhe des Digitalisspiegels im Blut und in den Geweben als Maß für die enterale Wirksamkeit wird von den relativen Geschwindigkeiten der Resorption und Ausscheidung bestimmt. Z.B. beruht die enterale Unwirksamkeit von Strophanthin auf seiner hohen Polarität und damit geringen Lipidlöslichkeit. Die schlechte Lipidlöslichkeit von Lanatosid C resultiert aus dem seitenständigen polaren Glukosemolekül in der Zuckerkette; infolgedessen ist die enterale Resorption verlangsamt und die biliäre und Harnausscheidung beschleunigt. Erst in den distalen Darmabschnitten setzt eine bakterielle Desglucosylierung und Desacetylierung ein, wodurch enteral Digoxin metabolisiert wird, das die Bedingungen 1 und 2 erfüllt und effektiv resorbiert wird. Das Ergebnis ist eine verzögerte Resorption bei Tier und Mensch (98,470); erst nach einer Latenz von

6 Stunden kommt es zu einem ansteigenden Glykosidspiegel, der in Wirklichkeit ein Digoxinspiegel ist. Acetylierung und Methylierung verbessern die Lipidlöslichkeit und können daher die enterale Wirksamkeit steigern (β -Acetyldigoxin, β -Methyldigoxin). Eine Desacetylierung erfolgt bereits in der Mukosa während der Resorption, wodurch das natürliche Glykosid im Blut erscheint (194,372). Mit dem β -Acetyldigoxin gelang der Durchbruch einer Entkopplung von hoher Resorption und langer Wirkungsdauer: β -Acetyldigoxin weist eine dem Digitoxin ähnlich hohe Resorption auf und ist gepaart mit der erstrebten mittleren Wirkungsdauer des Digoxins (194). Jedoch sind nicht alle Acetyl-derivate stabil genug, so z.B. das α -Acetylgitoxin; durch Magensäure oder Esterasen des Darmsaftes setzt bereits vor der Resorption die Abspaltung der als Gleitschiene gedachten Acetylgruppe an der endständigen Digitoxyse ein (371). Pentaacetyldigoxin erfährt im Gegensatz zum Pentaacetylgitoxin nach Resorption keine komplette Desacetylierung, weshalb die biol. Wirksamkeit schwächer ist als für Digoxin (34).

3. Stabilität (322). Eine langsame Metabolisierung sichert eine über die Zeit genügend lange Blut- und auch Gewebskonzentration. Digitoxin z.B. erfüllt alle 3 Kriterien und hat somit eine gute Enteralwirksamkeit. Dagegen ist sein Aglykon Digitoxigenin bei enteraler Verabreichung unwirksam, weil es sehr schnell metabolisiert wird (Nichterfüllung der 3. Anforderung); trotz schneller und vollständiger Resorption (Erfüllung des 1. und 2. Kriteriums) kann sich kein genügend hoher Wirkspiegel im Blut bilden.

3.1 Grundzüge der Pharmakokinetik von Digitalis

Die Pharmakokinetik analysiert Zeitabläufe bei der Resorption, Verteilung (Invasion, Penetration), Verstoffwechselung (Metabolisierung) und Ausscheidung (Exkretion, Evasion) von Medikamenten im unversehrten Organismus. Dabei werden in Blut, Geweben und Exkrementen (Urin, Galle, Stuhl) Konzentra-

tionen der primären Substanz oder ihrer Abbauprodukte als Funktion der Zeit und der verabreichten Dosis gemessen. Aus den gewonnenen Daten werden Konzentrationszeitkurven erstellt, aus denen kinetische Konstanten wie z.B. Eliminationskonstanten und Eliminationshalbwertszeiten errechnet werden können. Auf Analogrechnern lassen sich Partialkurven für kinetische Kompartimentmodelle simulieren und auf Digitalcomputern Rechenoperationen durchführen, die bis zur Vorausberechnung von Erhaltungsdosen reichen. Solche dynamischen Modelle, die das Schicksal eines Medikamentes als Funktion der Zeit beschreiben, liefern ein sogenanntes pharmakokinetisches Profil der interessierenden Substanz (158).

Die Kombination von Radioisotopentechnik und chromatographischen Verfahren stellt z.Z. die optimale Methodik zur Interpretation von pharmakokinetischen Problemen auf dem Glykosidsektor dar (133). Auch die biologische Aktivität isolierter Abbauprodukte ist in vitro testbar (435).

Pharmakokinetische Studien geben Auskunft über die Ausscheidungsfähigkeit von Niere, Leber, Galle und Darm sowie über den Transport durch Membranen und über die Bindung des Pharmakons im Gewebe. Das Verständnis über die Wirkungsweise z.B. der Herzglykoside und ihres Metabolismus wird somit vertieft.

Jede Species hat ihr eigenes pharmakokinetisches Profil infolge differenter Stoffwechsel- und Eliminationsmuster. Auch innerhalb der gleichen Species, wie z.B. beim Menschen, können noch interindividuelle, ja sogar intraindividuelle Abweichungen bestehen (102,352), die unabhängig von Geschlecht, Alter, Körpergewicht, Krankheit genetisch codiert zu sein scheinen.

Pharmakokinetische Profile von Tierspecies haben für den Menschen meistens nur eine eingeschränkte Gültigkeit (379), weil die Stoffwechsellmuster sowohl art- als auch glykosidspezifisch sind. Dennoch gibt es Ähnlichkeiten wie z.B. im Digitalis-Metabolismus von Mensch und Ratte (214,278); das

Meerschweinchen vermag dagegen Digitoxin nicht in Digoxin durch C_{12} -Hydroxylierung zu transformieren oder β -Methyl-digoxin zu demethylieren (452). Durch Perfusion der Meerschweinchenleber mit Ouabain konnte nachgewiesen werden, daß dieses Glykosid oder dessen Metabolite nicht in die Galle übertraten (246). Digitoxin wurde von derselben Species schnell metabolisiert zu polaren Metaboliten sowie zu Mono- und Bisdigitoxodigitoxigenin, die in die Galle ausgeschieden wurden; auffälligerweise enthielt die Gallenflüssigkeit weder Digitoxin noch Digoxin. Perfundiertes Digoxin wurde in der Meerschweinchenleber langsam verstoffwechselt, wobei in der Galle keine Abbauprodukte der Zuckerkette wie Mono- oder Bisdigitoxodigoxigenin nachgewiesen werden konnten.

Die Herzen von Meerschweinchen und Mensch reagieren ähnlich auf Digitalisstoffe; dagegen ist das Rattenherz weitgehend digitalis-refraktär (pro kg Körpergewicht toleriert die Ratte eine um den Faktor 100 größere Digitalisdosis als der Mensch (370)).

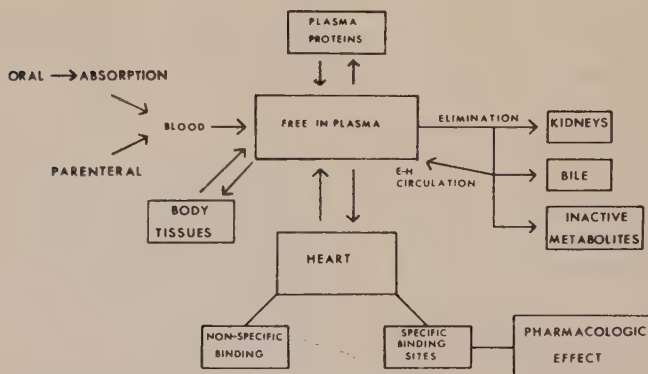


Abb. 4: Mehrkammermodell für Herzglykoside, in dem auch die Proteinbindung und der enterohepatische Kreislauf berücksichtigt sind.
(Entnommen: Binnion, P.F. (47)).

Die vielfältigen kommunizierenden Kompartimente für Herzglykoside in Form eines Mehrkammermodells, einschließlich der Proteinbindung und des extrahepatischen Kreislaufs, sind in Abb. 4 dargestellt.

Die Ursache für eine Medikament-Proteinbindung ist in der schlechten Wasserlöslichkeit bzw. Apolarität des Pharmakons zu sehen. Nur die ungebundene Form eines Arzneistoffes ist imstande, pharmakologische Effekte auszulösen (99). In gebundener Form kann ein Medikament nicht mit seinem Rezeptor am Erfolgsorgan reagieren. Zwischen gebundener und freier Form besteht ein Gleichgewichtszustand nach dem Massenwirkungsgesetz. Sinkt die Konzentration des freien Anteils im Plasmawasser ab, so wird wieder eine entsprechende Menge der Substanz aus der Plasmaproteinbindung bis zur neuen Gleichgewichtseinstellung freigegeben.

Beim enterohepatischen Kreislauf (enterohepatic recycling) handelt es sich um eine Reabsorption von bereits über die Galle ausgeschiedenen konjugierten Metaboliten, die im Darm bakteriell wieder ~~entkoppelt~~ entkoppelt werden (fermentative Abtrennung von Sulfat und Glucuronsäure durch Sulfatase und β -Glucuronidase).

Eine quantitativ unterschiedlich große Anreicherung einer Substanz in den einzelnen Organen läßt den Schluß auf uneinheitliche Affinitäten und differente Assoziationskonstanten zu.

Die Blutkonzentration (Blutspiegel) eines Pharmakons steht in enger Korrelation mit dem pharmakodynamischen Effekt. Für Cardenolide besteht eine direkte Proportionalität zwischen den Konzentrationen des Blutes und des Myokards; eine Konzentrationssteigerung des Herzglykosids führt daher über eine kardiotope zur kardiotoxischen Wirkung (141).

Die abfallende Serumkonzentration resultiert aus der Summe von 2,3 oder 4 (enterohepatische Rezirkulation) Einzelvorgängen (470).

Die Blutspiegelkurve nimmt in der pharmakokinetischen Analyse eine zentrale Stellung ein. Für Repke (372) ist der Blutspiegel ein Maß für die Einschätzung der oralen Wirksamkeit einer Digitalisverbindung, da in ihn alle limitierenden Faktoren eingehen. Der Blutspiegel ist also die Resultante vieler Partialprozesse.

Nach i.v. Injektion eines Cardenolids kommt es prinzipiell zu einem biexponentiellen - wenn nicht zu einem tri- oder multiexponentiellen je nach Versuchsanordnung und Frequenz der Blutprobenentnahme - Konzentrations-Zeit-Verlauf des Blutspiegels. Der Verlauf der Blutkonzentration ergibt eine komplizierte Funktionskurve (470). Der 1. schnell abfallende Kurventeil mit kurzer $t/2$ entspricht der Verteilung der Substanz in den Geweben. Diesem Kurvensegment kann noch ein kurzer Abschnitt als Ausdruck der intravasalen Verteilung des Cardenolids vorausgehen. Nach ca. 4-8 Stunden - durchschnittlich 6 Stunden - nimmt die Kurve einen flacheren Verlauf; dieser Abschnitt wird β -slope oder β -Phase bzw. Hauptsegment genannt.

Durch halblogarithmische Aufzeichnung, Anlegen von Tangenten, Extrapolation auf 0 und Subtraktion lassen sich graphisch für die verschiedenen Kurvensegmente Halbwertszeiten ablesen (Abb. 5). $t/2$ für den β -slope gilt als Eliminations- $t/2$ der Substanz und ist für die meisten Digitalisglykoside der renalen Ausscheidungsgeschwindigkeit proportional; $t/2$ von Plasma und Urin sind fast identisch.

Da den meisten Ausscheidungen ein Vorgang 1. Ordnung zugrunde liegt, ist die Ausscheidungsgeschwindigkeit dc/dt der vorhandenen Stoffmenge c proportional; es gilt $dc/dt = k \cdot c$. Da dc/dt und k meßbar sind, ist die im Körper persistierende Substanzmenge c berechenbar. Der Eliminationskoeffizient k_e wird mathematisch aus der Gleichung des exponentiellen Konzentrationsabfalles $c = c_0 \cdot e^{-k_e \cdot t}$ als $k_e = \frac{\ln 2}{t/2}$ bestimmt.

Das sich relativ spät einstellende Gleichgewicht - besser Pseudogleichgewicht - bei Digitalisglykosiden nach 12-24 Stunden für Digoxin und seine Derivate (381,470) hat seine

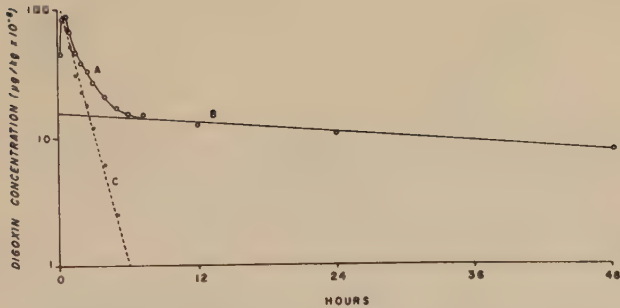


Abb. 5: Serumkonzentrationsprofil von markiertem Digoxin nach oraler Gabe (Mittelwertskurve von 12 Patienten). Das Kurvensegment A entspricht vorwiegend der Verteilungsphase, das Kurvensegment B (β -slope) hauptsächlich der Elimination. Aus der Verlängerung von B auf den Zeitpunkt 0 ist $t/2$ der Elimination, aus der Subtraktion von A und B als Differenzkurve C ist $t/2$ der Verteilung bestimmbar.
(Entnommen: Doherty, J.E. et al. (105)).

Ursache in der Metabolisierung. Die Blutkonzentration setzt sich aus einer chloroformlöslichen (herzwirksame Substanzen, überwiegend die Primärschubstanz) und einer nicht-chloroformlöslichen Fraktion (herzunwirksame polare Metabolite) zusammen. Die Subtraktion der nicht chloroformlöslichen Fraktion von der Gesamtblutaktivität ergibt die Kurve der chloroformlöslichen herzwirksamen Glykoside, die nach Rietbrock (379) von Anfang an einer einfachen e-Funktion folgt.

Eine Nichtparallelität zwischen Blut- und Urinkurve mit längerer $t/2$ im Urin deutet auf einen 2. Eliminationsweg, nämlich auf die biliäre Elimination (35) hin; die Addition beider Exkretionsprozesse entspricht quantitativ der β -Phase der Blutkonzentration.

$t/2$ des β -slope wird bestimmt von der Eliminations- und Metabolisierungsgeschwindigkeit; beide Geschwindigkeiten zeigen eine Beziehung zur Polarität des Cardenolids (348). Je größer die Polarität, umso kürzer ist $t/2$ ($t/2$ für das gut polare Ouabain mit 5 OH-Gruppen am Steroidgerüst 5 Std.,

t/2 für das nahezu apolare Digitoxin mit nur einer OH-Gruppe am Steroidgerüst 9 Tage mit 74 $\pm$ 3% Metaboliten im 24 Stunden-Urin, t/2 für das mäßig polare Digoxin mit 2 OH-Gruppen am Steroidgerüst 44 Stunden mit 7 $\pm$ 2% Metaboliten im 24 Stunden-Harn).

t/2 der β -Phase ändert sich nicht mit der Art oder dem Schweregrad der Herzinsuffizienz (115). t/2 des β -slope ist eng korreliert mit der t/2 der kardioaktiven Wirkung (462); in der Aufzeigung solcher Zusammenhänge zeigt sich die klinische Orientierung der Pharmakokinetik.

Spiegelbildlich zur Serumkonzentration verhält sich das Verteilungsvolumen der Substanz ($V = D/y$; $D =$ applizierte Dosis $y =$ Serumkonzentration pro ml). Per definitionem ist das Verteilungsvolumen der für eine Gleichverteilung zwischen Blut und Gewebe erforderliche Raum. Infolge der Proteinbindung der meisten Cardenolide ist dieser Raum groß und beträgt oft das Mehrfache des Körpervolumens.

Die Ausscheidung der Cardenolide und ihrer Metabolite mit dem Harn wird in % der Dosis pro Zeitintervall oder auch als quantitative Clearancegröße angegeben (249,250,251). Bei der Berechnung der renalen Digitalis-Clearance muß die Eiweißbindung berücksichtigt werden, da nur der ungebundene Anteil eliminierbar ist. Unter der Prämisse, daß Cardenolide weder sezerniert noch rückresorbiert werden, gilt:

$$Cl_{\text{Cardenolid}} = GFR \cdot \left(1 - \frac{\text{EW-Bindung}}{100}\right)$$

Aus der Gleichung geht hervor, daß die Clearance um so kleiner ist, je größer die Eiweißbindung ist (g-Strophanthin 97 ml/min, Digitoxin 1-2 ml/min); Clearance und Proteinbindung sind negativ korreliert. Für Digitoxin wird jedoch eine renale Rückresorption aufgrund der Differenz zwischen errechneter und gemessener Clearance vermutet (251). Auch für Digoxin konnte an der Hundeniere mittels Stop-flow-Technik eine tubuläre Rückresorption nachgewiesen werden (243). Alter und Digitalis-Clearance scheinen auch bei sonst nierengesunden Patienten invers korreliert zu sein (98, 99, 143); so betrug bei einem Durchschnittsalter von 27 J. die Digoxin-Clearance 83, bei 61 J. 61 und bei 77 J. 53 ml/min.

Die Digoxin-Clearance korreliert sowohl mit der Inulin- als auch mit der Kreatinin-Clearance (52,58,106,122,148). Ausgehend von der globalen Eliminationskonstanten k_e des Digoxins, die sich additiv aus der renalen und extrarenalen Eliminationskonstanten k_r und k_{nr} zusammensetzt, und der Proportionalität von k_r mit der endogenen Kreatininclearance gibt Dettli (101,345) die Gleichung

$$k_e = k_{nr} + \alpha \cdot V_{Cl}$$

an, wobei α ein Proportionalitätsfaktor und V_{Cl} die individuelle Kreatininclearance bedeuten. Aus den Konzentrationszeitkurven von Serum und Urin sowie aus der Kreatinin-Clearance sind die Konstanten k_{nr} und α errechenbar; so ergibt sich die globale Eliminationskonstante für Digoxin als eine lineare Abhängige von der Größe der Kreatininclearance

$$k_e = 0,0063 + 0,00013 \cdot V_{Cl}$$

Diese Gleichung bildet die Grundlage für eine individuelle Digoxin-Dosierung (345) (Abb. 25).

Eine hohe und reproduzierbare enterale Resorption ist wegen der geringen therapeutischen Breite der Cardenolide eine wichtige Voraussetzung für eine rationelle Therapie. Um resorbiert zu werden, muß ein Herzglykosid sowohl wasser- als auch lipidlöslich sein (vgl. Gitoxin, das diese Bedingungen nicht erfüllt und deshalb nicht resorbiert werden kann; Strophanthin ist zwar wasserlöslich, aber nicht lipidlöslich und hat daher nur eine vernachlässigbare Resorption von 1-2% der verabreichten Dosis (176)).

Es besteht ein gesetzmäßiger negativer Zusammenhang zwischen der Resorption und der Polarität eines Pharmakons (59): hohe Polarität setzt die Resorptionsgröße herab (153,379). Acetylierung steigert die Lipidlöslichkeit und damit die Resorption (33,34,419). Das Maximum der Resorption der meisten Herzsteroiden liegt innerhalb der 1. Stunde post applicationem (64,107).

Die Resorption der Cardenolide scheint aktiv durch einen Transportvorgang zu erfolgen (278,450). Die Resorptionsgeschwindigkeit ist im Tierexperiment (Patte) dosisabhängig

entsprechend einem Sättigungsvorgang (276,277,389). Ein solcher kapazitätsbeschränkter aktiver Resorptionsprozeß, für den ein Carrier vermutet werden darf, dürfte kompetitierbar sein durch andere Substanzen bzw. Pharmaka. Neomycin vermag z.B. die Resorption von Digoxin und Lanatosid C zu reduzieren, nachgewiesen an einer um das 4-fache geringeren renalen Ausscheidungsrate der tritierten Glykoside (22,318). Über den Mechanismus dieser verminderten Resorption ist literarisch nichts vermerkt - u.E. ist eine unlösliche Komplexbildung oder eine Kompetition zu vermuten. Erwiesenermaßen hemmen Cardenolide die Glukoseresorption (94,95), möglicherweise über eine Verdrängung am gleichen Transportsystem, da beide Substanzen im selben Darmabschnitt (proximaler Dünndarm) resorbiert werden (377), oder über eine Inhibition der für die Resorption erforderlichen Glukose-Phosphorylierung.

Rietbrock und Mitarbeiter (1,379) fanden an der Ratte einen biphasischen Resorptionsverlauf für alle untersuchten Glykoside (g-Strophanthin, Digoxin, β -Acetyldigoxin, β -Methyldigoxin) mit einer schnellen 1. Phase in der 1.-2. Stunde. Obwohl die einzelnen Darmabschnitte - Duodenum, Jejunum, Colon - unterschiedlich große Resorptionsraten im Verhältnis 4:2:1 zeigten, blieb die Biphasen-Charakteristik erhalten. Unter Berücksichtigung einer tierexperimentell gesicherten Glykosidsekretion der Mukosa aus dem Blutpool in das Darmlumen (3,4,203) - Nachweis markierter Cardenolide in den Faeces trotz Galledrainage nach außen nach i.v. Applikation der Testsubstanz - wird für die Glykosidresorption die Hypothese aufgestellt, daß die Resorption ein Nettobetrag zweier simultan ablaufender inverser Transportvorgänge sei: Diffusion durch die Mukosa in Richtung Blut - Sekretion vom Blut über die Mukosa in das Darmlumen. Während die Diffusion species-unabhängig ist, ist die Sekretion species-verschieden; insofern sind die Resorptionsgrößen des Tierexperimentes nicht in jedem Falle für den Menschen repräsentativ.

Unter enteraler Wirksamkeit versteht die Klinik das Verhältnis von venöser zu oral verabreichter Dosis eines Herzste-

roids, die zur gleichen kardialen Wirkung führt. Enterale Wirksamkeit und Bioavailability sind per definitionem keine Synonyma, obgleich beide Termini den Resorptionsprozeß zur Voraussetzung haben.

Die einfachste Bestimmung der Resorptionsgröße (Resorptionsquote) für markierte Substanzen ist in der additiven Faecesmessung unter Berücksichtigung der verabfolgten Dosis bei Tier bzw. Mensch gegeben (123,379). Okita (348) gibt dafür folgende Berechnungsformel an:

$$\text{Resorp. (\%)} = \frac{\text{orale Dosis} - \text{Restmenge im 7 Tage-Stuhl}}{\text{orale Dosis}} \cdot 100$$

Soll die enterale Rückresorption nicht miterfaßt werden, so ist die Galle nach außen abzuleiten, was z.B. auch bei frisch operierten Gallenpatienten über Galledrainage unternommen worden ist (4,257,437). Jedoch genügt die Untersuchung des Stuhles als einziger Parameter nicht, weil damit noch nichts ausgesagt wird über das Verhalten der tatsächlich im Blut ankommenden Konzentrationen (348).

Die Resorptionsquote ist mit hinreichender Genauigkeit aus der kumulativen Urinausscheidung über mehrere Tage und Extrapolation auf $t \rightarrow \infty$ möglich (98 ,470). Der Vorteil dieses Vorgehens liegt in hohen dpm-Raten und im damit kleinen statistischen Fehler (auf exakte Stuhlsammlung muß unbedingt geachtet werden).

Die Bestimmung der Resorptionsquote kann auch aus der Blutspiegelkurve nach oraler und i.v. Glykosidgabe beim gleichen Probanden (intra-patient trial) nach dem Dost'schen Flächen-satz erfolgen - Flächenvergleich unter der Blutspiegelkurve (c·t-Fläche). Dagegen ist Kritik erhoben worden, weil bei Glykosiden die Gleichgewichtseinstellung in den einzelnen Kompartimenten nicht genügend rasch erfolgt. Eine Extrapolation der Fläche $t \rightarrow \infty$, wie sie für Urin und auch Blut der Dengler'sche Arbeitskreis unternommen hat, begegnet diesem Einwand. Dennoch bleibt aber der Nachteil einer zu geringen ^3H -Aktivität in den nächsten Tagen; dadurch können erhebliche statistische Fehler resultieren (98 ,99).

Blutspiegelverläufe können heute auch mittels RIA nachgewiesen werden (273). Die Probanden erhalten dabei keine

radioaktiv markierten Cardenolide und werden somit keiner Strahlenbelastung ausgesetzt. Bezüglich des Methodenvergleiches muß vorerst noch die Frage offen bleiben, ob auch für niedrige Konzentrationen eine ausreichende Übereinstimmung der Meßergebnisse mit der herkömmlichen Methode der Inkorporation von ^3H -Glykosiden gegeben ist.

Das kinetische Verhalten der Cardenolide mit den verschiedenen Detailvorgängen läßt sich mit mathematischen Modellen simulieren. Mindestens ein 2-Kompartiment-Modell ist für die Vielzahl der Prozesse erforderlich (269). Der Dengler'sche Arbeitskreis fand mit einem linearen offenen 2-Kammermodell eine befriedigende Approximation an die realen Verhältnisse (98, 99). Beide Kompartimente - zentrales und peripheres - stehen miteinander im Gleichgewicht; am zentralen lassen sich Invasion, Evasion und Metabolismus verfolgen. Unter der Prämisse, daß alle Einzelvorgänge Prozesse 1. Ordnung sind, wird mit einer 3-gliedrigen Exponentialsumme - $c_s(t) = A_1 e^{-Y_1 t} + A_2 e^{-Y_2 t} + A_3 e^{-Y_3 t}$ - die Kinetik dieses Modelles ausreichend beschrieben. Im terminalen Abschnitt der Blutspiegelkurve mit dem Pseudogleichgewicht (pseudo-distribution equilibrium, post-distributive phase) nähern sich die beiden ersten Glieder der Gleichung 0; entsprechend $c_s = A_3 e^{-Y_3 t}$ verläuft der β -slope monoexponentiell.

Die einmalige Bestimmung der Herzglykosidkonzentration im Serum mit empfindlichen Methoden wie z.B. dem RIA ergibt einen Konzentrationswert auf der pharmakokinetischen Blutspiegelkurve nur für einen bestimmten Zeitpunkt, der so gewählt werden sollte, daß er in die β -Phase der Blutspiegelkurve mit ihrem Pseudogleichgewicht - abgeschlossene Glykosidverteilung zwischen Blut und Geweben - fällt. Das Pseudogleichgewicht beginnt frühestens 6-8 Stunden (34, 98, 470) bzw. 18 Stunden (379) nach der Digoxingabe. Die Blutabnahme empfiehlt sich daher frühestens 8 Stunden nach der Einnahme von Digitalispräparaten (69, 98, 125, 263, 403, 470).

3.2 Pharmakokinetische Daten des Digoxins

Resorption: Sie erfolgt vorwiegend im oberen Dünndarm sowie gering auch im Magen, im unteren Dünndarm und im Colon (17, 178, 196). Eine geringe Menge wird über das Lymphsystem transportiert (19), der größte Teil passiert über die Pfortader die Leber. Resorptionsrate 80-85% (106, 120, 123), 75-80% aus Tabletten (118), bis 100% in alkoholischer Lösung. Nach anderen Literaturangaben beträgt die Resorption 79% bei jungen Probanden (51) oder $80,2 \pm 8,8\%$, errechnet aus der kumulativen renalen Exkretion mit Extrapolation von $t \rightarrow \infty$ (470), wobei innerhalb von 4 Tagen 50-60% resorbiert werden. Die geringere Resorption gegenüber Digitoxin beruht auf den Polaritätsunterschieden und auf der Resorptionsbeschränkung auf den oberen Dünndarmabschnitt (379). Reduzierte Resorption bei Patienten mit Dünndarmresektion, Sprue, gesteigerter Peristaltik, nicht aber bei Pankreasinsuffizienz (207); bei Malabsorption keine merkliche Resorptionsverminderung (197). Resorptionsreduktion auch durch Medikamente (Metoclopramid (304)), Ionenaustauscher (Cholestyramin (71), Colestipol (14)), Kaolin-Pectin (50).

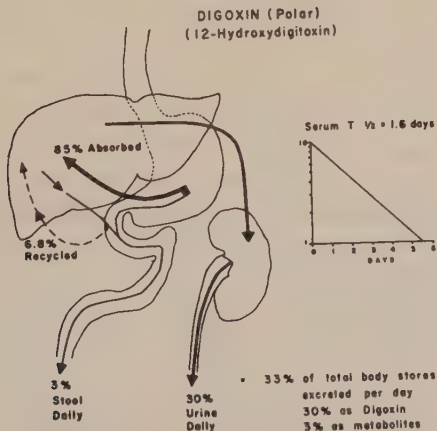


Abb. 6: Skizzierung der wesentlichsten pharmakokinetischen Daten von Digoxin beim Menschen.

(Entnommen: Doherty, J.E. et al. (120))

Verteilung: Schnelle Verteilung nach i.v. Injektion. Nach oraler Applikation hat die Verteilungsgeschwindigkeit eine $t/2$ von 60 Min. (105). Größte spezifische Organanreicherung in der Niere mit 0,138,ug/g Parenchym als Ausdruck des wichtigsten Exkretionsweges (114); in abfallender spezifischer Konzentration folgen Herzmuskel, Pankreas, Nebenniere, Zwerchfell, Leber, Schilddrüse, Skelettmuskel und andere Gewebe (Abb. 7). Geringste spezifische Anreicherung im Hirn mit 0,004,ug/g infolge der Blut-Hirnschranke. Spezifische Konzentration des Myokards 0,053,ug/g. Das Verhältnis von Myokard zu Serum zeigt eine relativ enge Gruppierung der graphisch dargestellten Werte (114); der Quotient reicht von 24,5-52,5 (abgegriffen aus der entsprechenden Darstellung von Doherty); im Mittel liegt die spezifische Konzentration von Digoxin im Myokard gegenüber dem Plasma um den Faktor 40 höher. Akkumulation im Herzmuskel erfolgt an spezifischen und unspezifischen Bindungsstellen (313). Skelettmuskulatur hat wegen ihrer großen Masse (40% des Körpergewichts) den größten Anteil am Digoxinpool und damit Reservoirfunktion trotz ihrer kleineren spezifischen Konzentration gegenüber anderen Organen (144).

Von Faktoren, die die Distribution beeinflussen, ist noch wenig bekannt. Beim Hund reduziert Hyperkaliämie (K^+ -Infusion) die Aufnahme von Digoxin im Myokard und in der Skelettmuskulatur (310) mit Anstieg der Serumkonzentration. Hypokaliämie hat einen species-differenten Einfluß auf die Anreicherung von Digoxin. Beim Hund steigert Hypokaliämie (Hämodialyse) nicht die Aufnahme im Myokard oder in der Skelettmuskulatur (309). Nachgewiesene Steigerung der Aufnahme von Digoxin am isolierten Papillarmuskel in niedrig konzentrierter K^+ -Lösung (357). Am perfundierten Meerschweinchenherzen besteht eine inverse Korrelation zwischen K^+ -Konzentration und Akkumulation (131). Die Infusion von Glukose und Insulin beim Hund induziert eine Hypokaliämie und damit eine Abnahme von Digoxin im Skelettmuskel - nicht aber im Herzmuskel - sowie einen Anstieg der Serumdigoxinkonzentration (155). Beim Meerschweinchen dagegen wird durch Insulininfusionen die Akkumulation von Digoxin im Myokard erhöht (132).

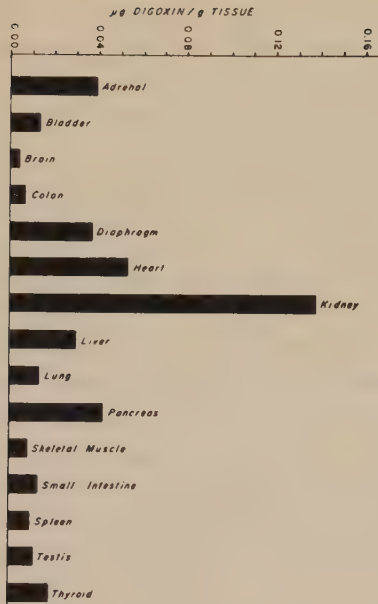


Abb. 7: Gewebsverteilung von ^3H -Digoxin beim Menschen (43-jähriger Patient mit chronischem Cor pulmonale) nach 1 mg ^3H -Digoxin i.v. 5,5 Stunden ante finem. (Entnommen: Doherty, J.E. (114)).

Reserpin senkt beim Hund die myokardiale Anreicherung von Digoxin (309). Bei Niereninsuffizienz kommt es beim gleichen Versuchstier zu einer vermehrten Digoxinakkumulation (307).

Proteinbindung: 15-25% (121) bzw. 20-30% (142,260,298,344) an Serumproteine, hauptsächlich an Albumin, Reduktion der Albuminkonzentration im Serum von 4 auf 1 g% verringert die Bindung um die Hälfte (23 auf 13%). Bei Hypercholesterinämie geringe Abnahme der Proteinbindung, nachgewiesen mittels Gelchromatographie (142).

Serumkonzentration: Nach i.v. Injektion steiler Abfall der Blutspiegelkurve in der Initialphase mit einer $t/2$ von 60 Min. (105); bereits nach 3 Minuten befinden sich nur noch 16% der Dosis im Blut (306), nach 1 Stunde 3% (144), nach

24 Stunden 1%. Maximum der Blutkonzentration bei oraler Gabe nach 1-1,5 Stunden (470), nach 1 Stunde beim nüchternen Probanden (306) oder verzögert nach 2 Stunden, wenn der Tracer zusammen mit Speisen eingenommen wurde (466). Im Blut nur 1% des Körperpools von Digoxin (115). Die überwiegend biphasische Blutspiegelkurve entspricht zwischen 12 und 24 Stunden in der β -Phase einer einfachen e-Funktion (98); Übergang in den langsameren β -slope ab 5-6 Stunden (105). In der β -Phase paralleler Kurvenverlauf unabhängig von der Applikationsform (i.v., i.m., oral) (123). Kein Unterschied im Turnover von Patienten mit und ohne Herzinsuffizienz (117, 306). $t/2$ des β -slope beträgt nach oraler Applikation 34 Stunden (106,108), 38 Stunden (305) oder 39,2 Stunden nach i.v. Gabe 50,8 Stunden (98), 41,0 $\pm$ 81 Stunden (470) oder 10,8-55 Stunden (106). $t/2$ ist beim Hund im Serum sowie in den Organen Leber, Niere und Herz etwa gleich groß: 23 h - 23 h - 22 h - 26 h (110). Die Serumkonzentration beträgt beim Menschen 1 Stunde nach 0,5 mg i.v. 1,2 ng/ml (143), nach 24 Stunden 0,45 ng/ml. Nach oraler Dauermedikation von 0,25 mg/d maximaler Serumspiegel von 2,1 ng/ml (98). Verteilungsvolumen 5,27 $\pm$ 0,55 l/kg Körpergewicht (98) bzw. 7,2 $\pm$ 3,0 l/kg (345).

Metabolismus: Wegen der besseren Polarität im Vergleich zu Digitoxin ist die Metabolisierungsrate klein- weniger als 5% (98, 470) bzw. 15-20% (115). Die Majorität wird renal eliminiert. Metabolisierungsweg läuft analog dem Digitoxin über schrittweise Spaltung der Zuckerkette und Glucuronidierung ab (4, 203, 379, 381) - Ausnahme scheint Meerschweinchen zu bilden; hier erfolgt keine Zuckerkettenspaltung, sondern Konjugation sogleich mit Digoxin (246). Im Urin wenig Metaboliten - ca. 10% (306), unter 2% (105), unter 5% (308,470). Im Chloroformextrakt der Galle 50% Digoxin, je 25% DG-2 und DG-1, nur 1-2% DG-O (118). In Galle und Faeces größerer Metabolitenanteil als im Urin (2, 308, 390). Bei der Ratte intensivere Metabolisierung mit 72,5% Metaboliten und 27,5% Digoxin in der chloroformlöslichen Fraktion (93). In der Rattengalle liegt mehr DG-2 als DG-1 vor (379).

Analog dem Urin ist auch im Myokard der Metabolitengehalt verschwindend klein. Der Alkohol-Chloroformextrakt des Herzmuskels vom Hund enthält über 80% unverändertes Digoxin und weniger als 5% DG-2 und DG-1 (309).

Exkretion: Überwiegend renale Ausscheidung (115). An der totalen Elimination beträgt der renale Anteil 60-80% (251), 90% (306) bzw. 67% (33% extrarenal) (345). Ausscheidung pro Tag 33% (120), davon 30% im Harn; nach anderen Literaturzitatzen 33-40% im Urin (21) bzw. ca. 30% (105, 106, 306, 446, 470) oder 40% (52). Innerhalb von 4 Tagen werden renal 60% der Dosis ausgeschieden (470). Totalausscheidung innerhalb von 2 Wochen 61,5% (308). $t/2$ der exponentiellen Urinexkretion 1,8 d, vergleichbar mit der $t/2$ von Faeces und Blutspiegel (306, 308, 310).

Clearance von Digoxin 73 ± 16 ml/Min. (erwartet 78,1) (251) oder 78,11 ml/Min (106); dagegen nur $42,6 \pm 6,14$ ml/Min. bei älteren Patienten von über 55 Jahren, errechnet nach dem Dost'schen Flächensatz der kumulativen Urinausscheidung nach i.v. Gabe des Tracers (98). Die Clearance von Digoxin ist eng korreliert mit der Inulin- und Kreatinin-Clearance (122, 429); Korrelationskoeffizient 0,92. Mit Reduktion der GFR nimmt linear die Clearance von Digoxin ab. Digoxin wird zu geringem Teil auch tubulär rückresorbiert, wie an der Hundeniere mittels Stop-flow-Technik bestätigt werden konnte (116, 446). Die Herzinsuffizienz ist ohne Einfluß auf die renale Digoxin-elimination (112). Die Peritonealdialyse beträgt nur 8 ml/Min. (5, 113); sie senkt nicht effektiv die Blutkonzentration an Digoxin. Bei Niereninsuffizienz ist die Exkretion verringert, folglich bleibt der Serumspiegel an Digoxin erhöht (249, 250, 251).

Mit der Galle werden 7-21% der Dosis in 24 Stunden eliminiert (21). Die Ratte scheidet in 5 Stunden 40% der ^3H -Aktivität biliär aus (93), in 12 Stunden 65-76% (379).

Mit den Faeces werden innerhalb von 1 Woche sowohl bei oraler als auch bei i.v. Gabe 10-20% der Dosis ausgeschieden (120, 161), pro Tag 3%, innerhalb von 2 Wochen 32,3% (308). Die Rückresorption im enterohepatischen Kreislauf beträgt nur 6,8% (120) bzw. 5-14% (21).

3.3 Pharmakokinetische Daten des Acetyldigoxins

Acetyldigoxin, insbesondere die β -Form, wird schnell desacetyliert zu Digoxin; so ist die Pharmakokinetik bis auf die Resorption weitgehend identisch mit der von Digoxin. Nachstehend werden nur vom Digoxin abweichende Daten aufgeführt.

Resorption: Für β -Acetyldigoxin 78%, berechnet nach der kumulativen Urinausscheidung (470), 96%, ermittelt aus dem planimetrischen Flächenvergleich der Blutkurven zwischen i.v. und oraler Gabe (390). Für α -Acetyldigoxin 80,2 $\pm$ 5,4%, berechnet nach der kumulativen Urinausscheidung und Extrapolation $t \rightarrow \infty$ (470); anfangs kleinere Resorptionsgeschwindigkeit, mit der Zeit zunehmend. Entsprechend unterschiedlich werden die Maxima der Blutkonzentration erreicht - nach 1-1,5 Stunden für β -Acetyldigoxin, nach 3 Stunden für α -Acetyldigoxin.

Metabolismus: Die Desacetylierung erfolgt hauptsächlich in der Mukosa und in der Leber (Pfortaderblut enthält bereits einen großen Anteil an Digoxin); Herz- und Skelettmuskulatur sowie das Blut selbst haben eine geringe Desacetylierungsrate (379). Die Abspaltung der Acetylgruppe geschieht bei der β -Form mit größerer Geschwindigkeit als bei der α -Form, weil die sterische α -Position stabiler ist (35). Unverändertes β -Acetyldigoxin erscheint im Harn zu weniger als 10%, unabhängig von der Applikationsform (i.v. oder oral) (470), oder zu keinem nachweisbaren Anteil im Urin und Blut (389). Bei der Ratte findet sich β -Acetyldigoxin zu 2-4% in der Galle und im Harn (379); 76% der Galle- und 66% der Harnaktivität waren Digoxin, der Rest DG-2, DG-1 und polare Metabolite. Nach i.v. Gabe von α -Acetyldigoxin findet sich im 24 Stunden-Urin die Hälfte der ^3H -Aktivität als unveränderte α -Form wieder, vom 2. bis zum 4. Tag fällt der α -Acetyldigoxinanteil kontinuierlich ab; nach oraler Applikation besteht eine große interindividuelle Streuung der Urinbefunde, prinzipiell aber eine Zunahme des Digoxinanteils mit der Zeit (470). In den Faeces liegen 5-31% als DG-O vor (389).

3.4 Pharmakokinetische Daten des β -Methyldigoxins

β -Methyldigoxin hat gegenüber Digoxin und β -Acetyldigoxin eine höhere Resorptionsquote und auch eine größere Resorptionsgeschwindigkeit (273,390). Die Demethylierung erfolgt fast ausschließlich in der Leber (379) und ist nicht so komplett wie die Desacetylierung des β -Acetyldigoxins (die renale Elimination des unveränderten β -Methyldigoxins ist größer als die des β -Acetyldigoxins). Die Serumkonzentration liegt bei gleicher oraler Dosis für β -Methyldigoxin höher als für Digoxin (273). Die Eliminationsgeschwindigkeit entspricht der des Digoxins (249,379).

Resorption: 80-90% (20) oder 90% innerhalb von 4 Tagen, errechnet nach der kumulativen Urinausscheidung (470); bei der Ratte 84% während der schnellen 1. Resorptionsphase und nur noch 2% in der langsamen 2. Phase innerhalb von 10 Stunden (379). Im Magen können 10% der Dosis der Säurehydrolyse unter Entstehung von DG-2, DG-1 und DG-0 unterliegen (20).

Serumkonzentration: Maximum der Blutkonzentration nach 15-30 Min. (379) oder 30 Min. (470) nach oraler Verabreichung. Nach ca. 6 Stunden geht die Aktivitätskurve des Blutes in die β -Phase über; zwischen 18 und 24 Stunden liegt ein monoexponentieller Verlauf vor (381); $t/2$ des β -slope 1,1-2,3 d (379) bzw. 1,8 d (249). Die β -Phasen von β -Methyl-, β -Acetyl- und Digoxin laufen parallel (273) (das spricht für analoge Eliminationsgeschwindigkeiten mit identischer $t/2$). Bei gleicher oraler Dosis von 0,5 mg steigt bei gesunden Probanden die Serumkonzentration für β -Methyldigoxin höher an als für β -Acetyl- und Digoxin, bestimmt mit dem RIA: β -Methyldigoxin 4,0 ng/ml nach 60 Min., Digoxin 1,8 ng/ml nach 90 Min., β -Acetyldigoxin wie Digoxin, nur etwas früheres Maximum (273).

Metabolismus: Nicht die Mukosa, sondern die Leber ist der Ort der Demethylierung im Gegensatz zur Desacetylierung (381) (im Pfortaderblut hauptsächlich β -Methyldigoxin). Literaturangaben über das Ausmaß der Metabolisierung, einschließlich der Demethylierung, schwanken - wahrscheinlich besteht eine

große interindividuelle Variation. β -Methyldigoxin kann 95% der Urinaktivität betragen, nur ca. 5% sind Metabolite wie DG-2, DG-1 und Dihydrodigoxigenin (470). Innerhalb des 1. Tages sind 40% (20) bzw. die Hälfte (251) der renal ausgeschiedenen ³H-Aktivität Digoxin. Als Ausdruck zunehmender Metabolisierung steigt im Harn der Digoxinanteil täglich an - von 28% am 1. Tag auf 63% am 7. Tag (379). In der Rattengalle ist der Anteil der nicht-chloroformlöslichen Metabolitenfraktion groß, bestehend aus DG-0 und seinem Epimer, gekoppelt an Glucuron- und Schwefelsäure (379). Die chloroformlösliche Gallenfraktion beträgt 63% (entsprechende Urinfraktion 40%); davon sind 40-45% DG-1 (im Urin 30%), der übrige Anteil ist DG-2.

Bei cholezystektomierten Patienten mit Gallenabflußdrain entfielen nach i.v. Gabe 5% der innerhalb von 5 Stunden abgeflossenen Galle-Aktivität auf DG-2 (nur Spuren von DG-1) und 55,3 % auf polare Metabolite (im Harn 15,5%) (4); d.h. der Anteil polarer Metabolite ist in der menschlichen Galle prozentual 4-mal größer als im Urin. Durch Inkubation der Galle mit Faeces (Glucuronidase, Sulfatase) erwies sich der größte Teil der polaren Metabolitenfraktion als DG-1. Der Nachweis von DG-1 im menschlichen Stuhl ist als bakterielles Entkopplungsprodukt polarer, mit der Galle ausgeschiedener Metabolite anzusehen.

Exkretion: Der renale Anteil an der Totalausscheidung beträgt 60-80% (251) bzw. 75% innerhalb von 2 Wochen (20). In 24 Stunden werden renal 29-36% (20), in 3 Tagen 40% (251), in 7 Tagen 55% (379) eliminiert. Die Clearance beträgt 73 ± 16 ml/Min. (251). Über die Galle werden in 24 Stunden 7-18% der Dosis eliminiert (251). Die Ausscheidung über die Faeces innerhalb von 7 Tagen beträgt 30% (379) mit geringer Rückresorption über den enterohepatischen Kreislauf von 5-14% (20).

4.1 Relevanz der Serumdigoxinkonzentration

Die geringe therapeutische Breite der Herzglykoside birgt in sich das Risiko einer Überdigitalisierung, besonders bei

zu brüsker Dosierung, bei Fixierung auf ein starres Dosierungsschema und bei renaler Eliminationsstörung. Nach prospektiven Studien beläuft sich die Digitalisintoxikationsquote auf 5% (217) bzw. 20-30% (25). In einer Sammelstatistik des Jahres 1974 aus 7 Bostoner Spitälern betrugen die eingewiesenen Digoxinintoxikationen 16,1% aller Medikamentintoxikationen und rangierten damit an erster Stelle unter den medikamentösen Überdosierungen (323). 1971 wurde in den USA Digoxin als das fünft häufigste Medikament verordnet (336).

Die Digitaliskonzentration im Blut ist so gering, daß sie allein mit chemischen Methoden nicht bestimmt werden kann. Im Zustand des Pseudoequilibriums befindet sich nur etwa 1% der verabreichten Dosis im Blut (114,347). Der Bestimmung der Digitaliskonzentration im Serum kann nur dann eine klinische Relevanz zukommen, wenn erwiesenermaßen eine enge Korrelation zwischen der Glykosidkonzentration im Serum und dem Erfolgsorgan besteht. Beweise einer solchen Korrelation konnten auch für den Menschen anhand autoptischer bzw. biopischer Vergleichsuntersuchungen erbracht werden. Generell liegen die Myokardkonzentrationen um das Vielfache höher als die Serumspiegel. Es wurden jedoch unterschiedliche Myokard-Serumverhältnisse bei allerdings verschieden großen Zeitintervallen nach der vorausgegangenen Digoxingabe beschrieben: 30:1 (114), 39-155:1 (91), 25-128:1 (74), 19-177:1 (362), 18-29:1 (189). Die großen Streuungen erklären sich sowohl methodisch (Gewebsaufarbeitung) als auch durch den variablen Fett- und Bindegewebsanteil der entnommenen Myokardproben in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Myokarderkrankung (91), vom Ort des entnommenen Biopsiematerials und dem Anteil unspezifischer Digoxinakkumulation. Das Myokard-Serumverhältnis ist um so konstanter, je größer das Zeitintervall zwischen der letzten Digoxinapplikation und der Probenentnahmen ist (189). Die Pharmakokinetik des Digoxins zeigt erst nach ca. 6 Stunden - sowohl nach oraler als auch nach i.v. Verabreichung - den Übergang in ein Pseudo-Verteilungsgleichgewicht (Abb.8): nach etwa 12 Stunden nimmt die Blutspiegelkurve einen einfachen expo-

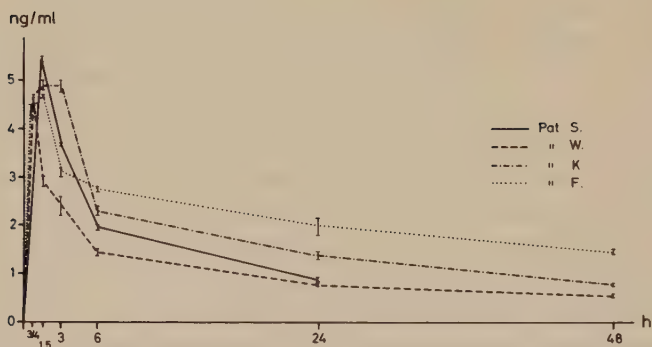


Abb. 8: Digoxin-Konzentrationsprofile im Serum über 48 Stunden von 4 Patienten nach einmaliger oraler Einnahme von 1,5mg Reindigoxin der Fa. Boehringer, Mannheim, in kristalliner Form in einer Gelatine-Kapsel, bestimmt mit dem RIA C (^{125}J -markiert). Zwischen 6 und 24 Stunden ist die zeitliche Konzentrationsänderung weniger steil als zwischen 3 und 6 Stunden; nach 6 Stunden ist die Digoxin-Verteilung zwischen Blut und Geweben weitgehend hergestellt.

nentiellen Verlauf als Ausdruck der von nun ab nur noch erfolgenden Elimination (98). Die Eliminations- $t/2$ für Digoxin beträgt durchschnittlich 33 Stunden (106), nach anderen Untersuchern $39,3 \pm 4,8$ Stunden nach oraler und $50,8 \pm 4,9$ Stunden nach i.v. Gabe (98). Eine repräsentative Digoxinkonzentrationsbestimmung im Serum sollte daher nicht vor 6 Stunden, besser jedoch 12 Stunden nach der letzten Einnahme erfolgen.

Als Orientierung für den unter einer optimalen Digitalisierung zu erwartenden Serumdigoxinspiegel kann die an gesunden Probanden gemessene Serumkonzentration von $1,4 \pm 0,3$ ng/ml gelten, wobei die Probanden täglich $0,5 \text{ mg } ^3\text{H}$ -Digoxin erhielten (308).

Bei klinischer Intoxikationssymptomatik bestehen signifikant 2-3-mal höhere Serumkonzentrationen als bei optimal digitalisierten Patienten (Tabelle 3). Auch im therapeutischen Bereich besteht eine Korrelation zwischen der Höhe der gewählten Erhaltungsdosis und dem Serumspegel (Abb. 9). Für ein einheitliches Körpergewicht konnte sogar eine lineare Pro-

portionalität zwischen Serumkonzentration und verordneter Dosis mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,995 erkannt werden (271).

Zwischen den Serumkonzentrationen von klinisch intoxikierten und nicht intoxikierten Patienten existiert ein Überlappungsbereich, insbesondere zwischen 1,8 und 2,5 ng/ml (220). Daher ist es trotz signifikantem Konzentrationsunterschied zwischen intoxikierten und nicht intoxikierten Patientenkollektiven für den Einzelfall leider nicht möglich, eine exakte Grenzkonzentration zu definieren (407). Ursachen für das Überlappungsphänomen scheinen in individuellen Unterschieden, z.B. im Digoxin-Verteilungsraum (53), in der Digoxin-Serumalbuminbindung, im Myokard-Serumkonzentrationsverhältnis und nicht zuletzt in der Sensitivität des Myokards zu liegen (220). Nicht übersehen werden sollten aber auch in diesem Zusammenhang falsche Resultate, die sich aus methodischen Schwierigkeiten ergeben können (8, 67, 75, 151, 220, 439).

Eine verminderte Digitalistoleranz mit Serumdigoxinkonzentrationen im Überlappungsbereich kann z.B. auf Elektrolytstörungen wie Hypokaliämie (92, 357), Hypercalcämie (338), hormonellen Einflüssen wie bei Hypothyreose (109), auf verminderter

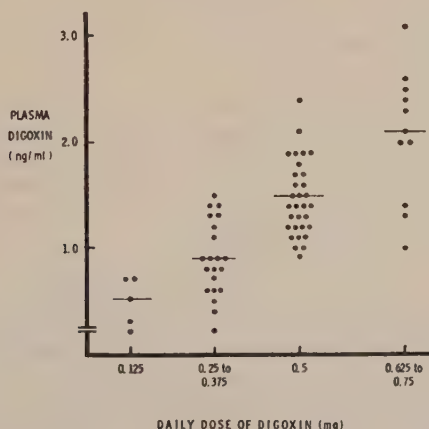


Abb. 9: Proportionalität zwischen Serumdigoxinspiegel und oraler Erhaltungsdosis, erhoben an 68 Patienten. (Entnommen: Chamberlain, D.A. et al. (77)).

O₂-Perfusion des Myokards wie bei Coronarsklerose (25,141, 401) oder bei chronischen pulmonalen Erkrankungen (25,315) beruhen. Im Vergleich zu herzgesunden Personen, die in suicidaler Absicht hohe Digitalisdosen einnahmen, reagiert ein geschädigtes Herz bereits bei wesentlich kleineren Dosen mit toxischen Rhythmusstörungen (412). Supraventrikuläre Tachykardien bedürfen oft höherer Digitalisdosen (47,77, 401); die darunter auftretenden höheren Serumkonzentrationen werden in der Regel toleriert. Selbst bei Serumdigoxinkonzentrationen von 10 ng/ml zeigten einige Patienten noch normalen Sinusrhythmus und keinerlei subjektive Unverträglichkeitssymptome (47).

Die Niereninsuffizienz fördert eine Digoxinkumulation über eine verminderte Elimination, da ca. 80-90% dieses Glykosids in überwiegend unveränderter Form renal ausgeschieden werden (107). Mit der Verlängerung der Eliminations-t/2 steigt der Serum-Digoxinspiegel an (52,107,249,271,423). Auffallenderweise tolerieren Nierenpatienten höhere Serumdigoxinspiegel, die in den Überlappungsbereich fallen, besser als Nierengesunde. Intoxikationssymptome zeigen sich bei Niereninsuffizienten erst ab einer höheren Serumkonzentration (271). Dieses relative Toleranzphänomen ist sehr wahrscheinlich auf die renale Acidose und Hyperkaliämie zurückzuführen (252), die erwiesenermaßen eine Toleranzsteigerung für Digitalis begünstigen (224,242,412).

Patienten mit künstlichem Herzschrittmacher können ebenfalls höhere Serumdigoxinspiegel aufweisen (271). Als Ursache wird eine verminderte glomeruläre Filtration bei primär reduziertem Herzzeitvolumen diskutiert: unter dieser Prämisse ist die renale Digoxinelimination herabgesetzt, folglich persistiert Digoxin mit einer höheren Konzentration im Serum.

Ältere Patienten tendieren zu einer herabgesetzten Digitalistoleranz mit entsprechenden Intoxikationssymptomen (25,141, 143,188); es werden bei einer durchschnittlichen Dosierung häufig höhere bzw. erhöhte Serumdigoxinspiegel gefunden. Für diese Erscheinung werden ursächlich mehrere Faktoren angenommen: Einschränkung der Nierenfunktion mit nachgewiesener

herabgesetzter Digoxinclearance (53 ml/Min. bei durchschnittlich 77 Jahre alten Patienten (143), 61 ml/Min. bei 61-Jährigen (98) gegenüber 83 ml/Min. bei 27 Jahre alten Personen (143)), größere Digitalisempfindlichkeit des gealterten Myokards (69), Reduktion der Skelettmuskulatur mit konsekutiv vermindertem Digitalisreservoir (143), verkleinertes Verteilungsvolumen.

Über Serumkonzentrationsbestimmungen können auch Rückschlüsse auf eine Beeinträchtigung der intestinalen Glykosidresorption gezogen werden, z.B. beim Malabsorptionssyndrom (207) oder durch Medikamente (14,50,71 ,288,302).

Mit der Bestimmung der Serumkonzentrationen läßt sich auch die biologische Verfügbarkeit (Bioavailability) von Digoxin-Präparaten (46,99 ,222,287,301,340,395) beurteilen. Dabei werden die Serumkonzentrationen nach Resorption handelsüblicher Digoxinpräparate bestimmt und miteinander verglichen. Bei nicht beeinträchtigter Resorption und verabreichter gleichgroßer Digoxindosis wird die Höhe der Serumkonzentration durch die Galenik des Präparates bestimmt. Eine solche Prüfung der Bioavailability ist indiziert bei Umsetzung des Patienten auf ein anderes Digoxin-Präparat bzw. bei Einführung einer neuen Digoxin-Spezialität.

Da wegen der individuellen Digitalistoleranz, der unterschiedlichen Glykosidbedürftigkeit und dem Überlappungsphänomen die ermittelte Digitaliskonzentration des Serums allein für den Einzelfall keine scharfe Grenzziehung zwischen therapeutisch optimaler und toxischer Konzentration erlaubt, sollte eine Interpretation der Meßwerte nur in Synopsis mit relevanten klinischen und Labordaten erfolgen wie Elektrolytstatus (K^+ , Ca^{++} , Mg^{++}), Ekg, Säure-Basenhaushalt, pO_2 , Nieren- und Schilddrüsenfunktion, Kreuzreaktionen mit verordneten Medikamenten vom Steroidtyp (407). Mit der Bestimmung der Glykosidspiegel im Serum werden keineswegs bewährte Dosierungsschemen aufgegeben, wohl aber bieten sich verschiedene Kontrollmöglichkeiten an, wie Korrektur der Dosierung, Früherkennung von Intoxikationen, Interpretationshilfe bei Rhythmusstörungen (176).

Auch das gegenteilige Problem der Unterdigitalisierung bei zu vorsichtiger oder diskontinuierlicher Dosierung bzw. unregelmäßiger Tabletteneinnahme bei nachlässigen oder alten vergeßlichen Patienten kann vermittels Serumkonzentrationsbestimmungen aufgezeigt werden; in solchen Fällen ist nicht selten gar kein Digoxin im Serum nachweisbar (47).

4.2 Hyperdigoxinämie und Digoxinintoxikation

Im Intoxikationsregister der praktischen Medizin rangieren Digitalisintoxikationen infolge der schmalen therapeutischen Breite der Herzglykoside an erster Stelle (225,342). Nach der Häufigkeit ihrer Rezeptur standen 1971 in den USA die Herzglykoside an fünfter Stelle (124). Epidemiologische Literaturangaben über die Häufigkeit von Digitalisintoxikationen schwanken je nach Erhebungsland und Definition der den Begriff bestimmenden Symptomatik zwischen 8 und 35% (25,141, 167,225,230,233,342,343,387,394,426) bzw. nur um 5% in einer schwedischen prospektiven Studie mit streng definierter Digitalisvergiftung (Rückläufigkeit der Rhythmusstörungen im EKG nach Absetzen des Cardenolids) (217). Allein die auf Digitalis zu beziehende Letalität - Sekundärkomplikationen nicht eingerechnet - liegt zwischen 3 und 21% (9,159,211,387,402,426,447).

Führendes Symptom einer Digitalisintoxikation sind im EKG objektivierbare Rhythmusstörungen (9,43,45,87,89,150,170,215,218,226,280,372,387,398,402,465). Keine der verschiedenen Formen der Rhythmusstörungen ist für sich allein digitalisspezifisch (215); häufig sind jedoch ventrikuläre Extrasystolen als Bi- oder Trigemini, Sinustachykardie und Sinusarrhythmie (40,43,45,48), während av Überleitungsstörungen mehr Ausdruck einer Digitalisüberempfindlichkeit sind. Extrakardiale, mehr subjektive Symptome, wie Inappetenz, Nausea, Erbrechen, Sehstörungen, psychische Veränderungen, können zu 50-80% auftreten (281) und haben für eine Digitalisintoxikation den Wert von verdächtigen Anzeichen (88,124,281). Digitalisintoxikationen werden häufiger bei nachstehenden

Krankheitsbildern beobachtet: Hypokaliämie in 11-15% der Intoxikationen (127,397,410,447), Magnesiummangel (24,337,416), akuter Herzinfarkt (327,436), chronische koronare Herzkrankheit (CHD) (73,141,343,368), chronisches Cor pulmonale (25,202,326), chronische Lungenkrankheiten mit Hypoxämie (12,397), hohes Alter (25,98,217,436), Niereninsuffizienz für Digoxin (25,52,77,101,115,188,217,250,251,307,401). Gewicht und Geschlecht disponieren nach prospektiven Studien nicht für eine Digitalisintoxikation (25,217).

Vorrangige Risikofaktoren für eine Digitalisintoxikation sind demnach Alter, Hypokaliämie als Folge diuretischer Langzeittherapie und Niereninsuffizienz für die Digoxinbehandlung.

Unter den endokrinen Erkrankungen zeigt die Hypothyreose eine Hyperdigitalisämie (111,135).

Seit den labortechnischen Möglichkeiten, die Serumkonzentrationen von Herzglykosiden quantitativ mittels RIA oder ^{86}Rb -Test zu bestimmen, sind Vergleichsuntersuchungen zwischen Serumspiegel und Digitalisintoxikationen angestellt worden (38,45,69,77,170,218,398,402,403,465). Definierte Intoxikationen hatten z.B. 24 Stunden nach der letzten Glykosiddosis einen Digoxin-Mittelwert im Serum von $3,1 \pm 0,7$ ng/ml, bestimmt mit der ^{86}Rb -Methode (40) - im Vergleich dazu lag der Serumspiegel bei nicht-intoxikierten, kardial kompensierten Patienten im Mittel bei $1,4 \pm 0,5$ ng/ml.

Der Digoxinspiegel im Serum zeigte bei Patienten, die wegen einer absoluten Arrhythmie mit diesem Glykosid behandelt wurden, eine signifikant negative Korrelation zwischen der Höhe der Serumkonzentration und der Kammerfrequenz (77).

Nur eine lockere Beziehung zwischen Serumspiegel und EKG-Veränderungen bestand an einem großen, mit Digoxin behandelten Krankengut (43,45); noch bei einem Serumdigoxinspiegel von 10 ng/ml hatten einige Patienten weiterhin einen normalen Sinusrhythmus und keinerlei Intoxikationssymptome. "Many patients were found in sinus rhythm who had elevated plasma digoxin levels in the range of 3,0 ng/ml to 10,0 ng/ml" (47). Eine andere Mitteilung (384) über 76 digoxinintoxikierte

Patienten mit über 2,5 ng/ml Digoxin im Serum berichtet über das Vorherrschen von av Überleitungsstörungen 1. bis 3. Grades (42 Fälle), dagegen war unter den 26 Fällen mit supraventrikulären und ventrikulären Extrasystolen ein Bigeminus relativ selten (5 Fälle). Die verschiedenen Formen der Reizbildungs- und Reizleitungsstörungen korrelierten nicht mit der Höhe der Digoxinserumkonzentration.

Über keinen Unterschied in der Serumkonzentration zwischen digitalisintoxikierten und nicht-intoxikierten Patienten wird in der Literatur nur selten berichtet (151).

Beim Vergleich von digitalis-intoxikierten und nicht intoxikierten Patienten ergab sich keine scharfe Trennungslinie in der Serumkonzentration, sondern eine erhebliche Überlappung der Einzelwerte für beide Gruppen (40,43,77 ,402). Jedoch zeichnete sich deutlich die Tendenz ab, daß Intoxikationen mit höheren Serumspiegeln einhergingen. Oberhalb von 1,7-2 ng Digoxin/ml Serum (25,40,77 ,402) bzw. von 3 ng/ml (43,44,384) lag das Gros der Intoxikationsfälle. Im Bereich von 2-3 ng/ml fanden sich die häufigsten Überschneidungen von intoxikierten und nicht-intoxikierten Fällen (40,77 ,402).

Das Überlappungsphänomen hat seine Ursachen seltener in der Bestimmungsmethode als vielmehr in der geringen therapeutischen Breite der Herzglykoside und in der großen Variation biologischer Faktoren am Herzen selbst, die die Toleranz gegenüber Herzglykosiden herabsetzen können.

Trotz der nicht strengen Grenzlinie im Serumspiegel zwischen Intoxikation und Nicht-Intoxikation betrachten die meisten Autoren die quantitative Digitalisbestimmung im Serum als einen für die Klinik wertvollen Orientierungsparameter, der Rückschlüsse 1. auf die gewählte Dosierung und 2. auf die globale individuelle Reaktionslage (Glykosidempfindlichkeit) des zu behandelnden Herzens erlaubt. Wenn auch für die meisten Fälle eine klinische Exploration und eine EKG-Untersuchung zur Diagnose einer Intoxikation genügen (77 ,217), so beantwortet doch die Digitaliskonzentration im Serum die Alternativfrage, ob eine zu hohe Digitalisdosis inkorporiert worden oder ob eine Änderung in der Glykosidtoleranz einge-

treten ist. Durch die Möglichkeit der quantitativen Digitalisbestimmung im Serum erhält der Kliniker eine breitere Basis für seine therapeutischen Maßnahmen. "I would like to emphasize that plasma concentrations should never be the sole arbiter of dosage, but should always be considered in the full clinical context" (78). "There is, however, general agreement that the serum digoxin level is a useful tool in the management of patients who require the drug" (124). "Plasma digoxin measurements are also useful in determining whether patients are taking digoxin correctly and whether the tablets are being effectively absorbed. They help to give a greater degree of control over therapy and in this manner help in educating the medical staff in the correct use of digoxin" (47).

4.3 Hypodigoxinämie

Eine optimale Digitalisierung ist nach dem pharmakodynamischen Gesetz der Dosis-Wirkungsbeziehung Voraussetzung für eine kardiale Rekompensation und für die Erhaltung dieses Zustandes. Serumkonzentrationsbestimmungen mittels RIA und ⁸⁶Rb-Test können neben klinischen Parametern Orientierungshilfen bei der Festlegung der Erhaltungsdosis sein.

Nach einer prospektiven Studie in den USA sind zu niedrige Serumspiegel, die die Herztherapie in Frage stellen, mit 36% der ambulanten und 11% der hospitalisierten Patienten gar nicht so selten; diese Patienten hatten Digoxinserumkonzentrationen von weniger als 0,4 ng/ml (210).

Eine Vielzahl von Ursachen kommt für zu niedrige Digitaliskonzentrationen im Blut in Frage:

1. Fehlende Sorgfalt bei der Einhaltung der Dosierungsanweisung, wie oft bei alten und vergeßlichen Patienten festzustellen ist.
2. Furcht des behandelnden Arztes vor einer Überdosierung.

3. Ungünstige galenische Zubereitung des Digitalispräparates.
4. Hyperthyreose.
5. Individuell größere Metabolisierungs- bzw. Eliminationsgeschwindigkeiten (359,438).
6. Malabsorptionssyndrom (77 ,168,207). Bei Sprue, Dünndarmresektionen, Ileitiden verschiedenster Genese wurden um das 3-fache geringere Serumkonzentrationen gegenüber einer Kontrollgruppe bei gleicher oraler Digoxindosis festgestellt (0,4 ng/ml gegenüber 1,3 ng/ml (168)); die Ursache liegt in einer verminderten Resorption. Maldigestion wie z.B. bei chronischer Pankreasinsuffizienz war dagegen ohne negativen Einfluß.
7. Antidiarrhoika (50). Von einem Kaolin-Pektinpräparat (Kaopectate) wurde bekannt, daß es die Resorption von Digoxin herabsetzen kann (auf 0,4 ng/ml in der 1. und 4. Stunde gegenüber 1,7 und 0,6 ng/ml einer Kontrollgruppe bei täglicher Einnahme von 0,5 mg Digoxin). Für Aktivkohle wird in Analogie zur erwiesenen reduzierten Aspirin-Resorption (283) eine ähnliche Herabsetzung der Resorption für Herzglykoside vermutet.
8. Antacida (50). Das untersuchte Präparat Maalox bewirkt ebenfalls eine Herabsetzung der Resorption für Digoxin (in der 1. und 4. Stunde 0,9 und 0,4 gegenüber 1,7 und 0,6 ng/ml).
9. Ionenaustauscher (14,50,71 ,72 ,405). Die für die Gallensäurebindung entwickelten Ionenaustauscher Cholestyramin und Cholestipol vermögen auch Digitoxin und Digoxin sowohl in vitro als auch im Magen-Darmtrakt von Versuchstieren (Ratte, Kaninchen) und des Menschen zu binden; dadurch wird die Serumkonzentration erniedrigt und die Serum-t/2 verkürzt (50,405). Cholestyramin soll allerdings gegenüber Cholestipol durch das Duodenalsekret in seiner Bindungskapazität abgeschwächt werden (14). Beide Ionenaustauscher werden therapeutisch bei Digitoxinintoxikationen zur Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes angewendet.

10. Neomycin (18,20,21,22,318). Gehemmt wird durch dieses schwer lösliche Antibiotikum sowohl die Resorption von Lanatosid C als auch von Digoxin (Abb. 10). Die erzeugte bakterielle Sterilität des Darmes kann zwar für die bakterielle Transformation von Lanatosid zu Digoxin relevant sein, nicht aber kann damit die Resorptionsstörung von Digoxin erklärt werden.
11. Metoclopramid (304). Dieses unter dem Handelsnamen Paspertin bekannte, die Peristaltik fördernde Präparat setzt durch Verkürzung der Resorptionszeit die Serumkonzentration von Digoxin deutlich herab (von 0,82 auf 0,56 ng/ml); nach Aussetzen des Paspertins steigt der Serumspiegel unter der Digoxindauertherapie wieder an.
12. 1-Dopa (304). Dieser Precursor für die Katecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin vermindert den Serumspiegel von Digoxin (von 0,86 auf 0,62 ng/ml). Der Effekt kommt sehr wahrscheinlich über eine gesteigerte renale Digoxinclearance zustande analog der erwiesenen Zunahme der Inulin- und PAH-Clearance durch 1-Dopa (149,399).

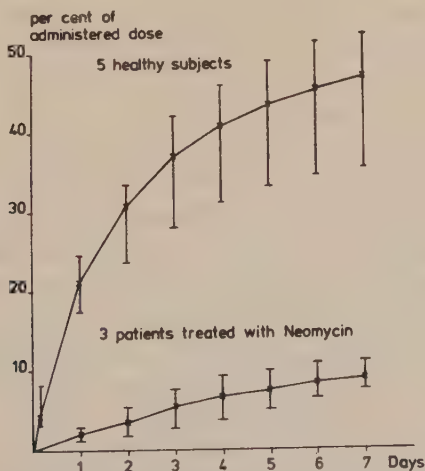


Abb. 10: Verminderte enterale Resorption von Lanatosid C durch Neomycin, veranschaulicht an der dementsprechend verminderten kumulativen renalen Ausscheidung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Neomycin nach oraler Verabreichung einer gleichgroßen Testdosis von Tritium-markiertem Lanatosid C.
(Entnommen: Maulitz, R.M. et al. (318)).

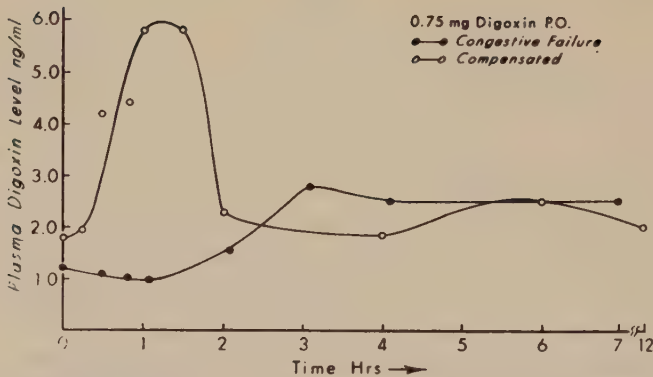


Abb. 11: Serumspiegelkurven eines Patienten mit feuchter Herzdekompensation, vor und nach Rekompensation mit oraler Digoxin-Verordnung. Bei venöser Rückstauung im Splanchnikusgebiet kommt es zu einer verzögerten Glykosidverteilung im Blutpool und damit zu niedrigen Konzentrationswerten im Blut des großen Kreislaufes.
(Entnommen: Oliver, G.C. (351))

13. Feuchte Herzdekompensation (164, 351, 419). Die von klinischer Seite wiederholt diskutierte herabgesetzte Digitalisresorption bei kardialer Stauung konnte quantitativ mit entsprechenden Serumkonzentrationsbestimmungen belegt werden. Bei Stauung im Splanchnikusgebiet bleibt der Serumspiegel erniedrigt, außerdem steigt er erst nach 2-3 Stunden verzögert an (Abb. 11). In Anlehnung an Tierexperimente (192) darf die Ursache hauptsächlich in einem verminderten venösen Blutfluß im Pfortaderkreislauf gesehen werden, aus dem das resorbierte Glykosid mit stark herabgesetzter Geschwindigkeit in den großen Kreislauf gelangt. Nach Rekompensation der Herzinsuffizienz stellen sich die bekannten Blutspiegelkurven mit initialem Peak wieder ein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß trotz ausreichend oral verordneter Herzglykoside erniedrigte Serumspiegel durch eine Vielzahl von Störfaktoren resultieren können. Besondere Erwähnung verdienen konkomitierend ver-

ordnete Medikamente, die die Resorption oder Elimination beeinflussen. Die Objektivierung erniedrigter Serumspiegel infolge Medikament-Interferenzen ist gegenwärtig mittels RIA möglich.

"It seems that the real problem in digitalis therapy no longer is restricted to toxicity alone. Probably it is as important to correct under-digitalization. Moreover the effect of digitalis therapy in for instance specific rhythm disorders is more dependent of a certain level of digitalis concentration than hitherto recognized. Also in this respect the access to determination of the serum levels of digitalis has opened a new era in medicine" (217).

4.4 Korrelation von Serumdigoxinspiegel und Myokardkonzentration

Es darf von der Vorstellung ausgegangen werden, daß im Zustand des Pseudogleichgewichtes eine Korrelation zwischen Serum- und Organkonzentration besteht und daß die Konzentration der Wirksubstanz im Organ die Intensität des pharmakodynamischen Effektes bestimmt (259). Für markiertes Digoxin hat Doherty (114) (Abb. 7) auf entsprechende Organverteilungen und z.T. auch auf Beziehungen zwischen Serum- und Organkonzentrationen hingewiesen. "The ratio of digoxin in the heart to that present in the serum ist 17 to 35:1 (mean 29:1), and the knowledge of increased digoxin serum levels would provide useful clinical information relative to myocardial digoxin content" (115). Eine günstige Korrelation zwischen der mikrosomalen Konzentration von 6 verschiedenen Cardenoliden in der Herzmuskulatur des Meerschweinchens mit den spezifischen Konzentrationen der übrigen Organe wurde sowohl in älteren als auch in jüngeren Untersuchungen festgestellt (130,243).

An Hunden konnte Doherty (110) belegen, daß die $t/2$ der Eliminationsgeschwindigkeiten des akkumulierten ^3H -Digoxins für das Blut und das Myokard etwa gleich groß sind (23 h für Blut, 26 h für Herzmuskel).

Da es methodisch nicht möglich ist, nur den spezifischen

Rezeptor des Myokards, an den die Cardenolide gebunden sind, isoliert zu bestimmen, wird die Konzentration des Muskelgewebes in toto gemessen (91), wodurch auch der Anteil der unspezifischen Bindung miterfasst wird (295).

Die Proportionalität zwischen spezifischer Konzentration und pharmakodynamischem Effekt von Digoxin konnte durch Hunderversuche belegt werden. Tachykardie trat oberhalb von 400ng/g (103) bzw. von 636-840 ng/g Ventrikelmuskulatur auf (44); zu diesem Zeitpunkt lag die spezifische Konzentration im Myokard weit höher als in der Skelettmuskulatur. Die Digoxinaufnahme im Myokard war durch verschiedene Substanzen beeinflussbar. Hyperkaliämie verringerte (310,312,324), Hypokaliämie erhöhte die kardiale Digoxinakkumulation (44,90, 155,169,310,311,357). Antiarrhythmika, wie Propranolol und Diphenylhydantoin (DPH), senkten am Hundemyokard (Ventrikel- und Vorhofmuskulatur) die ³H-Digoxinaufnahme um 13-20% (48); der Serumspiegel war unter DPH mit 11% leicht erniedrigt und unter Propranolol um 46% erhöht. Andere Antiarrhythmika, wie Arginin (6), Lidocain (7), Kalium (475), Phosphat (65), beeinflussten nicht die Digoxinkonzentration. β -Sympathikomimetika steigerten die Digoxinanreicherung im Myokard (15). Reserpin verringerte beim Hund die myokardiale Digoxinkonzentration - jedoch nicht über eine gesteigerte renale Ausscheidung, da auch an nephrektomierten Hunden die gleiche Beobachtung gemacht wurde (310); dieser Reserpineffekt konnte beim Meerschweinchen und Menschen (Blutkurvenvergleich) nicht nachgewiesen werden.

Beim Schaf besteht eine unterschiedliche Digoxinakkumulation im Herzen; die spezifische Leitungsmuskulatur hat eine um ca. 25% geringere Digoxinkonzentration als die Arbeitsmuskulatur (200).

Biopsiematerial aus der Vorhofsmuskulatur von 16 operierten Herzpatienten zeigte unter einer Dauermedikation mit Digoxin Myokardkonzentrationen von 34-648 ng/g ($\bar{x}$ 219 ng/g), während die Serumkonzentration zwischen 0,8 und 4,5 ng/ml variierte (Bestimmung mit dem ⁸⁶Rb-Test) (42). Daraus errechnet sich ein Myokard/Plasma-Quotient von 49-274. Dieser Quotient wurde

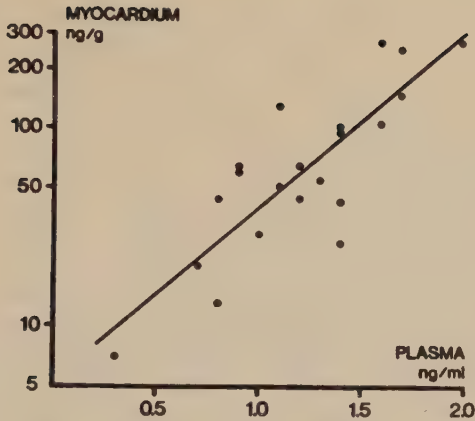


Abb. 12: Beziehung zwischen der Plasma- und Myokardkonzentration von Digoxin. Es besteht, wie pharmakokinetisch zu erwarten, eine positive Korrelation zwischen beiden Parametern.
(Entnommen: Redfors, A. (362))

stets kleiner bei Digoxinintoxikationen gefunden. Bis zu 210 ng/g wurden keine Arrhythmien beobachtet (228).

Eine andere Untersuchung an 21 Herzpatienten, die ebenfalls mit Digoxin dauerbehandelt waren, ergab ähnliche Resultate (361). Untersucht wurden mittels ^{86}Rb -Test Serum und Biopsiematerial der Vorhofsmuskulatur. Trotz großer Streuungen der Einzelwerte erwiesen sich hochsignifikante Korrelationen sowohl zwischen Plasma und Myokard ($r = 0,83$; $p < 0,001$) (Abb. 12) als auch zwischen Myokard und Skelettmuskulatur (Interkostalmuskulatur, M. rectus abdominis) $r = 0,80$; $p < 0,001$). Die ermittelten Einzelkonzentrationen variierten im Plasma zwischen 0,3 und 2,0 ng/ml, in der Vorhofsmuskulatur zwischen 7 und 283 ng/g; Mittelwerte betrugen 1,2 ng/ml, 91 ng/g und für die Skelettmuskulatur 44 ng/g. So ergaben sich Myokard/Plasma-Verhältnisse von 19-177:1 mit einem Mittelwert von 76:1. Um das Doppelte höher war die Konzentration im Herzmuskel gegenüber der Skelettmuskulatur.

Von 8 Patienten, die wegen einer chronischen rheumatischen Kardiopathie mit Digoxin langzeitbehandelt waren, ergab das

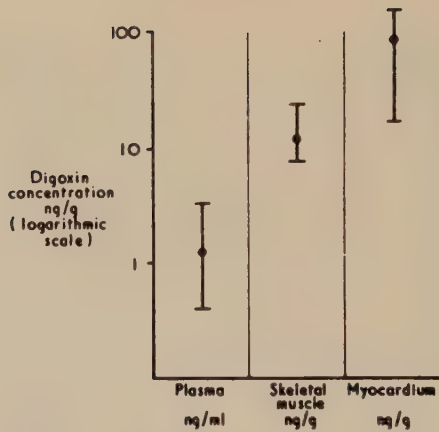


Abb. 13: Spezifische Digoxinkonzentrationen von 8 Patienten mit chronischer rheumatischer Kardiopathie. Bei großer Streuung der Einzelwerte betragen die mittleren Konzentrationen für das Plasma 1,2 ng/ml, für den M. latissimus dorsi 11,3 ng/g und für das Myokard 77,7 ng/g. Die spezifische Konzentration an Digoxin ist im Herzmuskel um das 7-fache größer als in der Skelettmuskulatur. (Entnommen: Coltart, J. et al. (91))

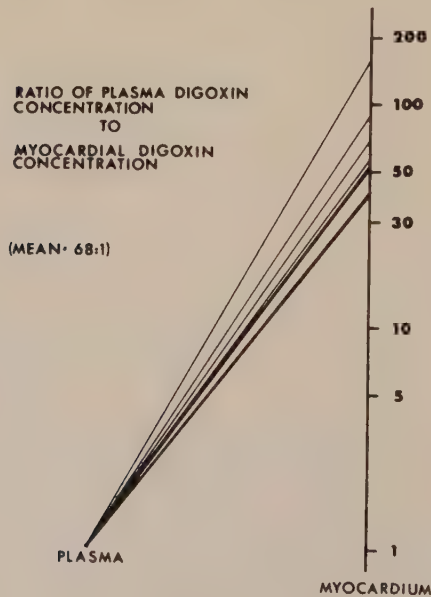


Abb. 14: Aus Abb. 13 ermittelte Myokard/Plasma-Verhältnisse für Digoxin. Diese variieren von 39-155:1 um das 4-fache; die mittlere Relation beträgt 68:1. (Entnommen: Chamberlain, D.A. (79))

zu Beginn einer Herzoperation entnommene Biopsiematerial von der Papillarmuskulatur nach entsprechender Aufarbeitung (Homogenisierung, Extraktion) und Konzentrationsbestimmung mittels RIA eine mittlere spezifische Konzentration von 77,7 ng/g mit wieder erheblicher Streuung der Einzelwerte (91) (Abb. 13). Die spezifische Konzentration des Myokards war wieder größer als die der Skelettmuskulatur (*M. latissimus dorsi*) mit 11,3 ng/g; die mittlere Serumkonzentration betrug 1,2 ng/ml. Das Myokard/Serum-Verhältnis variierte für die Einzelbestimmungen zwischen 39 und 155:1 stark um den Faktor 4; das mittlere Verhältnis errechnete sich auf 68:1 (Abb. 14).

Die großen Streuungen der Einzelwerte dürften multifaktoriell verursacht sein; folgende Erklärungen sind diskutabel: Unterschiedlicher Grad der pathologisch veränderten Herzmuskulatur (Fibrosierung) mit dadurch verschieden großen spezifischen Konzentrationen, variable Menge von unspezifisch eingelagertem Digoxin, Verschiedenheit von pH, pO_2 und Elektrolytkonzentrationen, unterschiedlicher Zeitpunkt der Gewebsentnahme (vgl. späte Einstellung des Pseudogleichgewichtes).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß zwischen Plasma, Myokard und Skelettmuskulatur Korrelationsverhältnisse für Digitalisglykoside bestehen, die Doherty (114) bereits an Autopsiefällen erkannte (Abb. 15), und die auch pharmakokinetisch nach abgeschlossener Gewebsverteilung im Pseudogleichgewicht der β -Phase zu erwarten sind. Dieses Verhältnis scheint für Digoxin besser reproduzierbar zu sein (68:1 (91), 76:1 (361)) als für Digitoxin (299,434). Redfors (362) vermerkt dazu: "The results thus indicate that there exists an indisputable relation between plasma and myocardial digoxin levels, but that this relation is complex".

Dennoch lassen die angeführten, vielseitigen, im Einzelfall nicht immer überschaubaren Einflüsse auf die Digitalisaufnahme im Myokard den Serumspiegel nicht immer repräsentativ für die Konzentrationsverhältnisse am Herzmuskel erscheinen. Kritisch schreibt dazu Marcus (313): "Again, the relevance

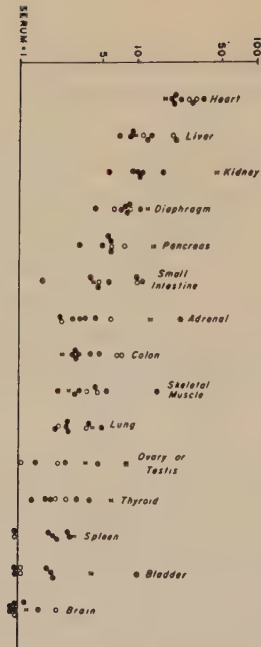


Abb. 15: Gewebe/Serum-Quotient von ^3H -Digoxin bei verstorbenen Patienten, abfallend angeordnet von oben nach unten. Es bedeuten volle Kreise Patienten mit Niereninsuffizienz, leere Kreise Patienten mit beidseitiger Nephrektomie, Kreuze Patienten mit normalem Serumkreatinin. Der Gewebe/Serum-Quotient ist am größten für den Herzmuskel (größer als für die Skelettmuskulatur) und am kleinsten für das Gehirn wegen der Blut-Hirnschranke für Herzglykoside. (Entnommen: Doherty, J.E. (114))

of these data to man needs further exploration. It may be important clinically because of our need to properly interpret blood concentrations of digoxin. Under the categories just described, the tissue-to-serum concentrations of digoxin are altered and serum concentrations may not accurately reflect the myocardial concentration of digoxin".

Bei der kritischen Wertung der großen Streuung der Einzelwerte müssen aber auch neben der methodischen Problematik, dem Zeitpunkt der Materialentnahme nach der letzten Dosis und dem unterschiedlichen Grad pathologischer Gewebsveränderungen die individuellen Variationen in der Protein-

bindung, im Metabolismus und des Verhältnisses der Serum/Myokardkonzentration bedacht werden (434).

Entscheidend für den kardiotonen Effekt ist aber nicht die bisher meßbare globale Digitaliskonzentration im Myokard, sondern die spezifisch an die äußere, dem Kapillarstrom zugewandte Oberfläche des Sarkolemm (438) - jedoch ist diese verschwindend kleine Menge, die auf ca. 10% der Myokardkonzentration geschätzt wird (361), z.Zt. nicht direkt bestimmbar. Hypothetisch dürfte die spezifisch am Myokard gebundene Digitalismenge besser als der globale Myokardgehalt mit dem freien Glykosidanteil im Plasma korrelieren. Aufgrund dieser sehr wahrscheinlichen Korrelation und der weitgehenden Parallelität zwischen der Höhe der Plasmakonzentration und der kardiotoxischen Symptomatik kann der bestimmbare Plasmaspiegel zu einem orientierenden Parameter in der Behandlung von digitalisbedürftigen Patienten werden. Storstein (438) wertet den Digitalis-Plasmaspiegel wie folgt: "As the digitalis effect is superficially located, the digitalis concentration in the plasma probably is of greater importance for digitalis effect than the concentration within the myocardial cell".

4.5 Serumdigoxinspiegel und Myokardtoleranz

Nach dem pharmakodynamischen Grundgesetz der Dosis-Wirkungsbeziehung darf angenommen werden, daß die Herzwirkung von Cardenoliden proportional der im Herzmuskel akkumulierten Glykosidmenge ist. Nach erfolgter Gewebsverteilung müßte diese Myokardkonzentration in einem konstanten Verhältnis zur Serumkonzentration stehen; somit dürften theoretisch bei ein und derselben Species trotz schmaler therapeutischer Breite der Herzglykoside niedrige Serumkonzentrationen innerhalb eines engen Bereiches kardiotope Effekte induzieren und Serumkonzentrationen oberhalb eines Grenzwertes kardiotoxische Wirkungen entstehen lassen. Die klinischen Beobachtungen an Herzpatienten - und nur für solche besteht die Indikation zur Digitalisverabreichung - lassen aber sehr oft Abweichungen

von diesem Konzept erkennen. Die Ursache für derartige Abweichungen liegt in einer multifaktoriellen Beeinflussung des Effektorgans Herzmuskel. Der morphologische, funktionelle und metabolische Zustand des Myokards bestimmt somit die Verschiedenheit der Reaktion auf die gleiche Dosis Digitalis (Abb. 16). Auf diesen Tatbestand sind die klinischen Begriffe der Toleranz und Intoleranz (Gykosidempfindlichkeit) zurückzuführen. Für jede Ausgangssituation müßte somit die optimale Gykosiddosis ermittelt werden entsprechend der klinischen Devise, daß jedes Herz seine individuelle Digitalisdosis und keine Schemadosis braucht (134). Daraus leitet sich ab, daß auch der Serumspiegel für jeden Patienten bei optimalem inotropen Effekt ein anderer sein muß. So kann ein und dieselbe Serumkonzentration bei verschiedenen Patienten einmal mit einer kardiotonen, ein andermal bereits mit einer toxischen Wirkung korreliert sein. Die laborchemisch bestimmte

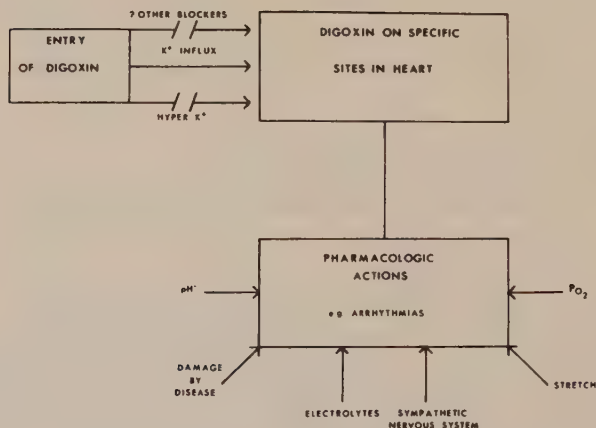


Abb. 16: Veranschaulichung der verschiedenen Faktoren, die die Digitaliswirkung am Herzen beeinflussen und somit zu einer Toleranzänderung führen können.
(Entnommen: Binnion, P.F. (47))

Serumkonzentration bedarf somit in jedem Falle ihrer Interpretation durch den Kliniker. Dieser kann bei Diskordanz des therapeutischen Serumspiegels und der verstärkten kardialen Reaktion, z.B. in Form von Rhythmusstörungen, aufgrund der differentialätiologischen Elimination einer zur Diskussion stehenden zu hohen Digitalisdosis auf eine Toleranzänderung schließen und diese therapeutisch und prognostisch berücksichtigen.

"The myocardial glycosid concentration together with the reactivity of individual myocardial cells is involved in the development of the pharmacological effects of the drug ..." (47).

Bekannt gewordene Faktoren, die die Toleranz des Myokards für Glykoside beeinflussen können, sind nachfolgend aufgeführt:

1. Konzentrationsänderungen des Cardenolids: Niereninsuffizienz führt zu einer Retention von Digoxin (25,52,77,101,115,188,217,249,250,307,401); damit steigt die Serumkonzentration und folglich auch die spezifische Myokardkonzentration, was einen kardiotoxischen Effekt nach sich ziehen kann. Im Alter ist aufgrund von involutiven Vorgängen die Digitalisclearance reduziert (z.B. von 83 ml/Min. bei 27-Jährigen über 61 bei 61-Jährigen auf 53 ml/Min. bei 77-Jährigen (98,143). Daraus resultiert ebenfalls wie bei der Niereninsuffizienz - wenn auch quantitativ geringer - eine höhere Digoxinkonzentration im Blut und Myokard (25,77,217,434).

Ein kleineres Körpergewicht kann bei einer Schemadosis zu überhöhten Serumspiegeln und somit zu Intoxikations-symptomen führen, wie wir bei einer Bioavailability-Testung beobachteten (Abb. 17). In Dosierungsformeln wird deshalb auch das Körpergewicht berücksichtigt (229).

2. Biochemische Änderungen: Hypokaliämie (z.B. chronische Diuretika-Verordnung) führt zu einer Steigerung der spezifischen Digitaliskonzentration im Myokard und dadurch zur Kardiotoxizität (27,44,294,369,371,372,374).

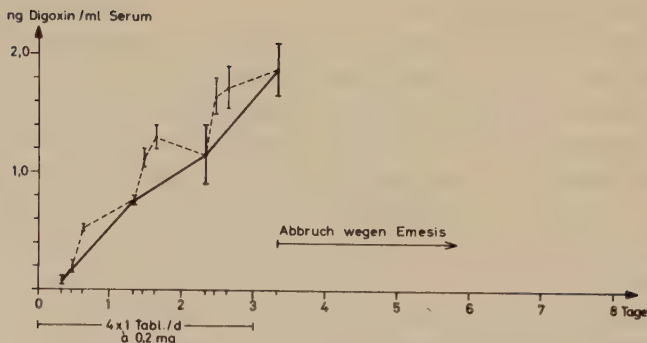


Abb. 17: Steiler Anstieg des Serumdigoxinspiegels während der Aufsättigungsphase mit β -Acetyldigoxin^R auf 1,88 ng/ml bei einem nur 48 Kg schweren Probanden. Digoxinbestimmung im Doppelansatz mit dem RIA B₂. Die vertikalen Balken markieren die Streubreite der Doppelbestimmungen. Bereits weniger als 2 ng/ml Digoxin im Serum wurden nicht mehr toleriert; Emesis trat auf als Ausdruck einer Digitalisintoxikation.

Eine Zunahme der intrazellulären Na^+ und Ca^{++} Konzentration verstärkt den Digitaliseffekt (sodium-calcium-coupling) (204, 247, 265, 266, 267, 268, 369, 374).

Änderungen von pO_2 , pH und der koronaren Durchblutung sowie Inhalationsanaesthetika wirken sich nachteilig auf den myokardialen Stoffwechsel aus (25, 204, 328, 468).

3. Pathologisch-anatomische Veränderungen: Myokardschwund durch Infarzierung oder Verschmelzung und die chronische koronare Herzkrankheit beeinflussen ebenso wie eine Gefügedilatation den Funktionszustand und den Stoffwechsel des Herzens, was wieder Rückwirkungen auf die Glykosidtoleranz haben kann (42, 43, 45).
4. Individuelle Variabilität: Diese bezieht sich auf interindividuelle Unterschiede der Glykosid-Proteinbindung im Serum und Myokard, der Verteilungsverhältnisse des Cardenolids zwischen Serum und Myokard, der Verstoffwechselung und der Eliminationsgeschwindigkeit des Herzsteroids (359, 434).

Aus der Aufzählung dieser sicher nicht vollständigen bzw. unserer Erkenntnis noch verborgenen Faktoren, die Funktionszustand und Metabolismus des Myokards und darüberhinaus auch dessen Glykosidtoleranz verändern können, wird verständlich, daß 1. keine konstante Dosis-Wirkungsbeziehung bestehen kann und 2. eine Überlappung der gemessenen Serumkonzentrationen in Relation zum induzierten Effekt bei der ohnehin schon geringen therapeutischen Breite der Herzglykoside resultieren muß.

4.6 Serumdigoxinspiegel und Stoffwechsellaage

Die Klinik kennt die veränderte Digitaliswirkung bei konkomitierenden Schilddrüsenerkrankungen. Hypothyreote Patienten reagieren empfindlicher auf Herzglykoside als euthyreote; sie haben eine geringere Digitalistoleranz und bedürfen deshalb kleinerer Digitalisdosen. Dagegen zeigen hyperthyreote Patienten eine große Toleranz für Digoxin, die bis zur Digitalisrefraktärität reichen kann. Es besteht also eine Wechselbeziehung zwischen dem Funktionszustand der Schilddrüse und der Digitaliswirksamkeit.

Tracer-Studien mit ^3H -Digoxin (111) haben gezeigt, daß die Digitalis-Serumkonzentrationen bei den verschiedenen Schilddrüsenfunktionszuständen unterschiedlich sind. Bei gleicher Digitalis-Dosis und übereinstimmendem Körpergewicht bestehen signifikant höhere Serumspiegel bei hypothyreoten und niedrigere bei hyperthyreoten Patienten sowohl nach intravenöser als auch nach oraler Applikation (Abb. 18). Die Serum- $t/2$ von Digoxin zeigt keinen signifikanten Unterschied bei den 3 verschiedenen Stoffwechsellaagen; auch die Eliminationsraten im Urin und Stuhl unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Unterschiedlich groß ist aber die renale Digoxin-Clearance; sie beträgt bei uneingeschränkter Nierenfunktion als Mittelwert für die Hyperthyreose 149,0 ml/Min., für die Hypothyreose 81,1 ml/Min. und für die Euthyreose 90,3 ml/Min.

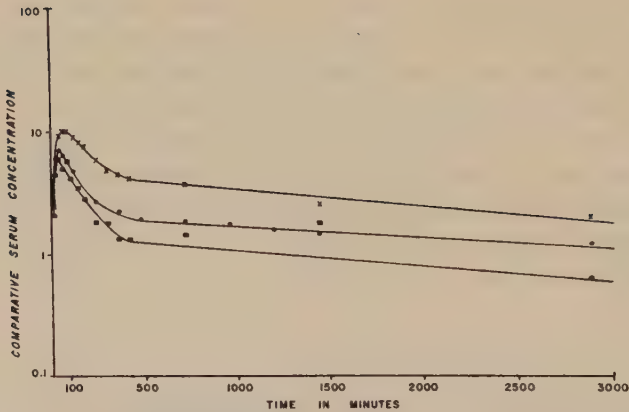


Abb. 18: Digoxin-Serumkurven bei hypo-, eu- und hyperthyreoten Patienten nach oraler Verabreichung der gleichen Dosis (etwa übereinstimmendes Körpergewicht). Es bedeuten Kreuze Hyperthyreose, Kreise Euthyreose und Rechtecke Hypothyreose.
(Entnommen: Doherty, J.E. (109))

Strophanthin und Digitoxin zeigen bei Hyper- und Hypothyreose prinzipiell analoge Serum-Turnoverkurven wie Digoxin (135). Strophanthin z.B. wird bei hyperthyreoten Patienten signifikant vermehrt ausgeschieden (64% der verabreichten Tracerdosis innerhalb von 48 Stunden gegenüber 52% bei euthyreoten und 37% bei hypothyreoten Patienten) zusammen mit einer größeren Harnmenge (1815 ± 270 ml/d gegenüber 1470 ± 40 ml/d bei euthyreoten und 1166 ± 186 ml/d bei hypothyreoten Patienten). Für Digitoxin läßt sich die gleiche Tendenz nachweisen, wenn auch die Meßwerte quantitativ nicht so deutlich sind wie für Strophanthin.

Die geringeren Serumkonzentrationen für Strophanthin und Digitoxin bei der Hyperthyreose könnten allein befriedigend durch die gesteigerte renale Elimination erklärt werden. Ein vermehrter Nieren-Plasmafluß und ein größeres Glomerulumfiltrat werden für die Mehrausscheidung von Urin, Strophanthin und Digitoxin angenommen (135). Dettli (100) vermutet bei der Hyperthyreose nicht nur eine Zunahme des Grundumsatzes, sondern auch der Geschwindigkeit des Arzneimittelmetabolismus.

Doherty (109) fand bei Hunden eine unterschiedliche spezifische Organanreicherung für ^3H -Digoxin bei der Hyper- und Hypothyreose; eine höhere spezifische Konzentration in den Organen Herz, Niere, Leber und Lunge bestand bei der Hyperthyreose.

Aus der tieferen und früheren Lage des Peaks in der Turnoverkurve des Blutes bei der Hyperthyreose vermutet Doherty (109) einen Unterschied im Verteilungsraum für Digoxin.

Dettli (100) und Scheler (422) schließen auf einen vergrößerten Verteilungsraum bei der Hyperthyreose aufgrund der auch nach i.v. Injektion der Herzglykoside bestehenden niedrigeren Serumkonzentration. Nach der mathematischen Beziehung

$$t/2 \text{ (Min)} = \frac{\ln 2 \times \text{Verteilungsraum (ml)}}{\text{Clearance des Herzglykosides (ml/Min)}}$$

wird verständlich, daß $t/2$ bei Vergrößerung des Verteilungsraumes und gleichzeitiger Erhöhung der renalen Digitalis-Clearance wie z.B. bei der Hyperthyreose durchaus konstant bleiben kann. Wegen des vergrößerten Verteilungsraumes ist die Glykosidkonzentration im Serum niedrig. Bei niedriger Serumkonzentration kann trotzdem die Clearance vergrößert sein, ohne daß die pro Min. ausgeschiedene Glykosidmenge vermehrt sein müßte (422). Die höhere Clearance bei der Hyperthyreose dürfte aus dem größeren Herzminutenvolumen und aus dem sich daraus ergebenden höheren arteriellen Mitteldruck mit folglich auch angehobenem Filtrationsdruck unter dem Einfluß von Trijodthyronin und Thyroxin resultieren.

So wird die klinisch beobachtete unterschiedliche Digitalistoleranz bei den verschiedenen Funktionszuständen der Schilddrüse interpretierbar auf der Basis verschieden großer Serumspiegel und demzufolge auch unterschiedlicher Myokardkonzentrationen. Die therapeutische Konsequenz der Klinik, bei Hyperthyreose mehr und bei Hypothyreose weniger Digitalis zu verabreichen, erhellt aus der unterschiedlichen Pharmakokinetik der Herzglykoside bei den verschiedenen Stoffwechsellagen.

4.7 Serumdigoxinspiegel und Niereninsuffizienz

Digoxin ist wasserlöslich und besitzt eine geringe Proteinbindung von 15-30% (121,142,260,298,344). Es wird deshalb vorwiegend renal und metabolisch fast unverändert ausgeschieden mit täglich 30-40% der verabreichten Dosis (21,52,105,106,107,120,306,446,470). Die Serum-t/2 beträgt 10-55 Stunden (98,106,108,305,470), als Durchschnittsgröße gibt Doherty (120) 1,6 Tage an. Die Digoxin-Clearance liegt für gesunde Erwachsene zwischen 73 und 78 ml/Min. (106,251), für Patienten über 55 Jahre bei durchschnittlich 42 ml/Min. (98). Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Digoxin- und Kreatininclearance (52,122,147) (Abb. 19) und auch der Inulinclearance (429) (Abb. 20).

Jüngere Untersuchungen haben ergeben, daß im Vergleich zur Inulinclearance die Digoxinclearance etwas größer ist (163,383,429) (Abb. 20). Diese Feststellung macht neben einer glomerulären Filtration auch eine tubuläre Sekretion sehr wahrscheinlich (383).

Bei dem bevorzugten renalen Ausscheidungsweg des Digoxins müssen Funktionseinschränkungen der Nieren zur Digoxinretention im Organismus mit entsprechend höheren Serumsiegeln und verlängerter Serum-t/2 führen (107) (Abb. 21). Dement-

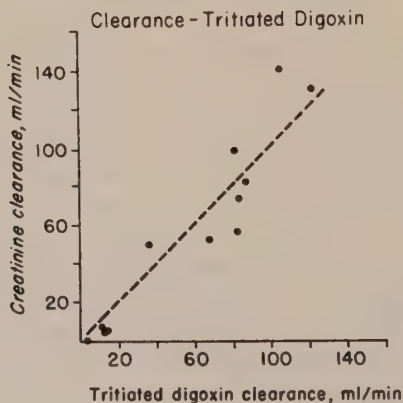


Abb. 19: Enge Korrelation von Digoxin- und Kreatininclearance. Clearance-Untersuchungen am 2.-4. Tag nach i.v. Applikation von 1 mg ^3H -Digoxin bei 4 nierengesunden und 8 nierenkranken Patienten.
(Entnommen: Bloom, P.M. et al (52))

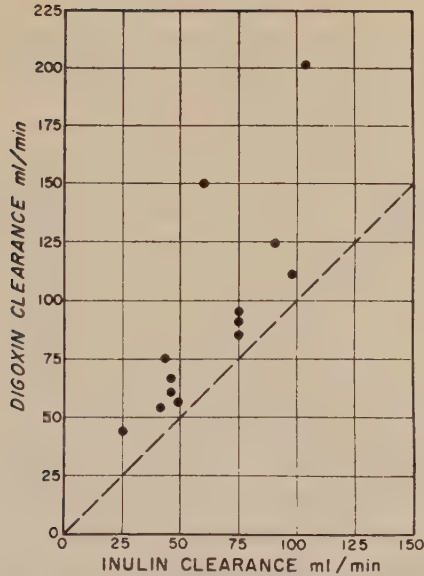


Abb. 20: Beziehung zwischen Inulin- und Digoxinclearance. Simultane Untersuchung von 13 Herzpatienten mit intakter Nierenfunktion, die auf eine konstante Digoxin-Erhaltungsdosis eingestellt waren. Digoxinbestimmung mittels RIA. Auffallend höhere Digoxinclearance. (Entnommen: Steiness, E. (429))

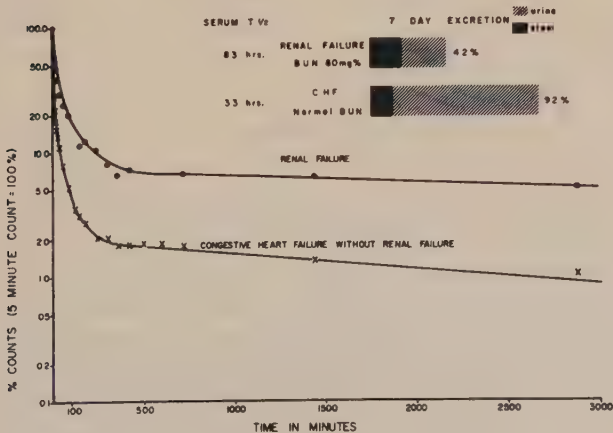


Abb. 21: Erhöhte Serumdigoxinkonzentration, verlängerte Serum- $t_{1/2}$ (obere Kurve) und entsprechend verminderte renale Digoxinausscheidung bei Niereninsuffizienz. Untersuchung mit ^3H -Digoxin nach i.v. Applikation an 13 Herzpatienten mit intakter Nierenfunktion und 12 Patienten mit Niereninsuffizienz. (Entnommen: Doherty, J.E. (107))

sprechend bestehen Korrelationen - wenn auch mit großer Streubreite - zwischen der Kreatininclearance sowie der Nierenplasmadurchströmung und der Höhe des Serumdigoxinspiegels (Abb. 22 und 23).

Niereninsuffiziente Patienten bedürfen wegen der Digoxinkumulation einer Kontrolle ihres Serumdigoxinspiegels. Mit RIA ist z.Zt. eine solche Observation möglich und der Einsatz dieser Methode sogar indiziert (188,252,271,273,407,408).

Auffallend tolerieren Patienten mit einer Niereninsuffizienz etwas höhere Digoxinspiegel im Vergleich zu Nierengesunden (252). Als Ursache werden die renale Acidose und die Hyperkaliämie diskutiert (252), neuerdings auch eine verminderte Digoxin-Myokardbindung (239) und ein verkleinertes Verteilungsvolumen, das von Reuning et al. (375) für Digoxin auf 163 l anstatt ca. 500 l bei Nierengesunden berechnet wurde. Somit befindet sich bei Niereninsuffizienz zumindest in einem Teil des Gewebskompartiments weniger Digoxin. Kleineres Verteilungsvolumen und reduzierte Myokardbindung für Digoxin bei Niereninsuffizienz dürften die Bedeutung von Schutzfunktionen haben - so erfährt die Toleranz gegenüber erhöhten Serumdigitalisspiegeln eine neue Interpretation. Eine medikamentöse Reduktion der glomerulären Filtrationsrate - z.B. durch Antihypertonica und Diuretica - kann ebenfalls zu einer Digoxinretention mit erhöhten, d.h. toxischen Serumdigoxinspiegeln führen (163).

Mit der Kontrolle von Digoxinspiegeln läßt sich die Quote der Digitalisintoxikationen vermindern, wie prospektive Studien mit einer Senkung von 13,9 auf 5,9 % bestätigt haben (245). Entsprechend dem gegenwärtigen Entwicklungsstand ist eine individuelle Dosierung anstatt der Verabreichung einer schematischen Schätzdosis möglich geworden. Jeliffe (231) hat in sein Nomogramm zur individuellen Dosierung bereits den Serumdigoxinspiegel neben anderen Parametern (Abb. 24) im Gegensatz zu Nomogrammen anderer Autoren (Abb. 25) integriert.

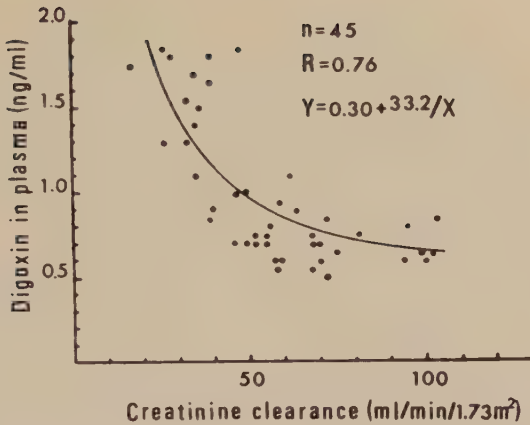


Abb. 22: Korrelation von Kreatininclearance und Serumdigoxinkonzentration. Ab einer Kreatininclearance von weniger als 50% steigt der Serumspegel von Digoxin an. (Entnommen: Falch, D. et al. (147))

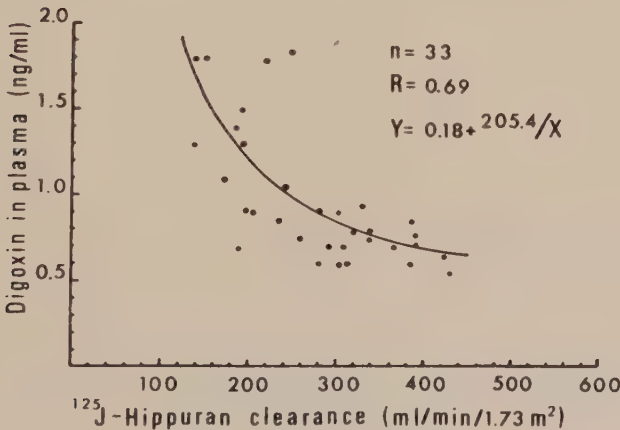


Abb. 23: Korrelation von Hippursäureclearance und Serumdigoxinkonzentration. Mit Reduktion des Nierenplasmastroms unter 50% erhöht sich der Serumspegel von Digoxin. (Entnommen: Falch, D. et al. (147))

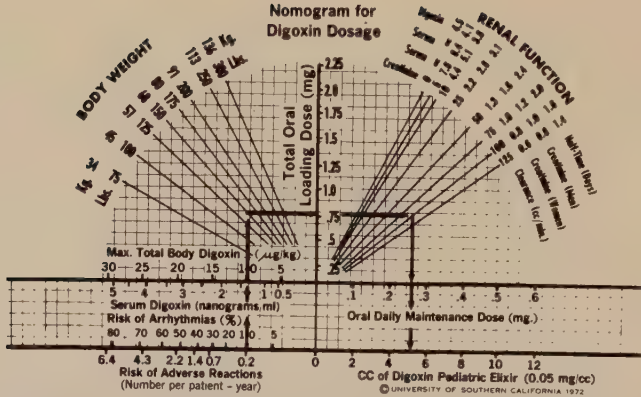


Abb. 24: Nomogramm zur Abschätzung der Richtdosis bei der Digoxinverordnung unter Berücksichtigung der Parameter Körpergewicht, Nierenfunktion, Sättigungsdosis, Digoxinspiegel im Serum und Rhythmusstörungen.
(Entnommen: Jelliffe, R.W. et al. (231))

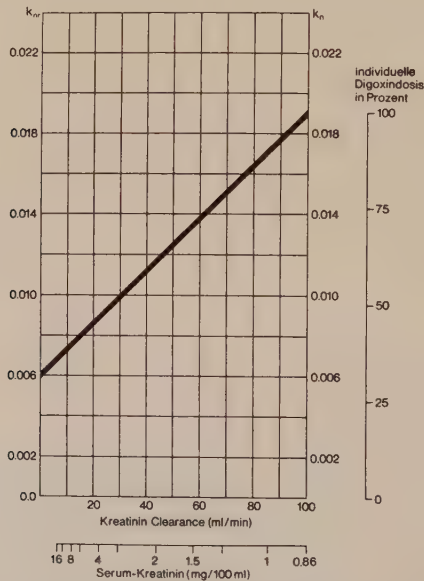


Abb. 25: Nomogramm zur individuellen Dosisanpassung für die Dauertherapie mit Digoxin bei niereninsuffizienten Patienten. Die schräg verlaufende Dosierungslinie zwischen den Eliminationskonstanten für Nierengesunde und Anuriker überzieht die auf der Abszisse aufgetragenen Kreatininclearancewerte von 0 bis 100 ml/Min. Rechts außen ist für diese Clearancegrößen die zu verabreichende prozentuale Digoxindosis - bezogen auf eine durchschnittliche Erhaltungsdosis nierengesunder Erwachsener - abzulesen.
(Entnommen: Ohnhaus, E.E. et al. (345))

5. Digitalisrezeptor

Die molekulare Wirkungsweise der Herzglykoside entfaltet sich, wie die intensive biochemische Forschung des vergangenen Jahrzehntes ergeben hat, an der biologisch aktiven Zellmembran. Wenn auch in verschiedenen Details noch hypothetisch, so gilt die Na^+ - K^+ -aktivierte Membran-ATPase als primärer Angriffspunkt (138,367,369,371,372,373,374) (Abb.26).

Bei der Erregung des Herzmuskels erfolgt electrophysiologisch eine Depolarisation der Zellmembran, die durch einen passiven intrazellulären Na^+ -Einstrom und einen ebenso passiven K^+ -Austritt entsprechend dem Ionenkonzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulärem Milieu zustandekommt (Abb. 27). Dabei verkleinert sich der intrazelluläre K^+/Na^+ -Quotient. Während der Diastole wird die Membran repolarisiert über eine Umkehrung des Ionentransportes, d.h. K^+ -Einwärts- und Na^+ -Auswärtstransport entgegen ihrem Konzentrationsgradienten. Dieser "Bergauftransport" ist ein aktiver und somit energieverbrauchender Vorgang, der in der älteren Literatur als

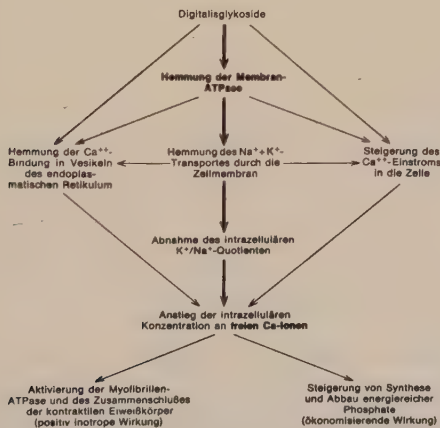


Abb. 26: Schema über den Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden am Myokard.
(Entnommen: Greeff, K. (175))

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpe bezeichnet und mit einem Drehtürmodell erklärt wird (175). Die hypothetische $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpe ist identisch mit der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -aktivierbaren Membran-ATPase. Dieses Enzym besitzt im nicht-phosphorylierten Zustand besonders affine Bindungsplätze für Na^+ auf der Innenseite der Membran. Unter ATP-Spaltung mit entsprechender Phosphorylierung des Enzyms in Gegenwart von Mg^{++} vollzieht sich eine Konformationsänderung, wobei die meist mit Na^+ besetzten Bindungsstellen auf die Außenseite der Membran gelangen. Mit dieser Änderung des Konformationszustandes geht eine Affinitätsänderung der Bindungsplätze zugunsten von K^+ einher; so wird auf der Membranaußenseite Na^+ abgegeben und K^+ aufgenommen - Na^+ wird somit nach auswärts transportiert. Mit der nachfolgend einsetzenden Dephosphorylierung der Membran-ATPase vollzieht sich wieder eine Rückkehr zum zuerst beschriebenen Konformationszustand mit höherer Na^+ -Affinität der Bindungsplätze; mit dieser Konformationsänderung werden die Bindungsstellen auf die Innenseite der Membran unter Mitnahme von K^+ rückverlagert - das entspricht dem K^+ -Einwärtstransport (244) (Abb. 28). Ein neuer Zyklus mit Na^+ -Beladung und Enzymphosphorylierung schließt sich an.

Während einer bestimmten Phase des Erregungsablaufes setzt ein Ca^{++} -Einwärtsstrom in die Muskelzelle ein und triggert die Freisetzung von Ca^{++} aus der gebundenen Form im sarkoplasmatischen Reticulum (393). Das Ergebnis ist eine intrazelluläre Erhöhung der freien ionisierten Ca^{++} -Konzentration. Ca^{++} binden und blockieren Troponin, dessen Funktion in der Unterbindung der Vereinigung von Actin und Myosin besteht. Mit der Calcium-Troponin-Inhibition wird so die elektromechanische Kopplung vollzogen.

Herzglykoside hemmen die Membran-ATPase. Dadurch besteht intrazellulär ein Defizit an K^+ und ein Überschuß an Na^+ . Diese Änderung des intrazellulären Elektrolytstatus verursacht eine experimentell bestätigte Erhöhung der freien Ca^{++} -Konzentration, die eine Steigerung der Basiskontraktilität (rested state contraction) und eine Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit bewirkt (244) und so den inotropen Effekt der Herzglykoside ausmacht.

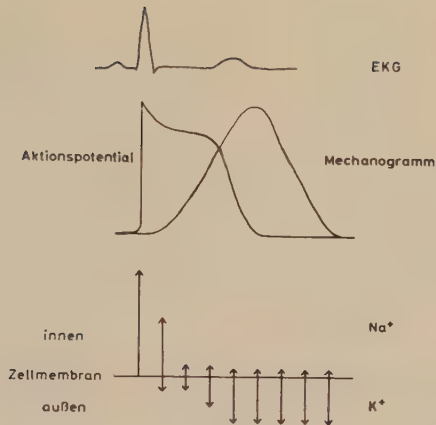


Abb. 27: Passive Na^+ - K^+ -Diffusion während der Erregung der Muskelzelle im Phasenbezug zum Aktionspotential, Mechanogramm und Ekg. Initial erfolgt der Na^+ -Einstrom. (Entnommen: Greeff, K. (175))

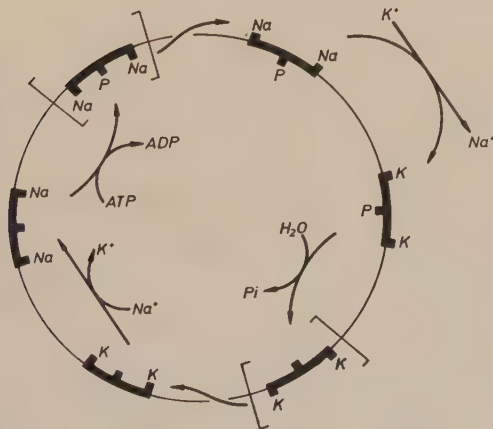


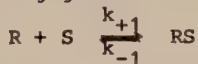
Abb. 28: Funktionszyklus der Na^+ - K^+ -aktivierbaren Membran-ATPase mit dem gerichteten transmembranären Transport von Na^+ und K^+ . In Klammern sind die hypothetischen Zwischenstufen der Konformationsänderungen gesetzt.

(Entnommen: Klaus, W. (244))

Die Korrelation zwischen der Reduktion der aktiven zellulären K^+ -Aufnahme durch herzwirksame Cardenolide und deren inotroper Aktion, erstmals 1955 von Kahn (240) erkannt, wurde wiederholt bestätigt (6,166,175,233,243,317). Herzunwirksame Glykoside zeigen nicht diesen Hemmeffekt auf den Kationentransport, d.h. auf die Membran-ATPase. Die strenge Parallelität von Herzwirksamkeit und Membran-ATPase-Inhibition erlaubt sogleich den Nachweis und die Differenzierung der biologischen Aktivität von Herzglykosiden, wofür verschiedene in vitro-Tests ausgearbeitet worden sind (61,62,66,138,292).

Repke und Portius deklarierten 1963 (367) die Membran-ATPase als Digitalisrezeptor; nach neueren Erkenntnissen ist dieser Rezeptor nur ein Teil des genannten Enzyms (138).

Der Hemmung des Rezeptors muß zuvor eine Bindung mit dem Cardenolid zu einem Herzglykosid-Rezeptor-Komplex vorausgehen. Diese Bindung ist reversibel (201,317) und unterliegt dem Massenwirkungsgesetz:



Aus den Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} lassen sich sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationskonstanten als Maß für die Affinität von Herzglykosiden zu ihrem Rezeptor berechnen (138,201). Für Strophanthin konnte z.B. an Rinderherzen eine hohe Affinität mit entsprechend kleiner Dissoziationskonstante von $0,28 \cdot 10^{-8}$ mol bestimmt werden (138). Diese Affinitäten lassen sich auch am Erythrozytenmodell prüfen (138). Tabelle 1 veranschaulicht an Hand der unterschiedlich großen Dissoziationskonstanten K_D die Parallelität zwischen der Stärke der Dissoziation und der pharmakologischen Wirksamkeit der verschiedenen Herzglykoside und ihrer Derivate: je größer die inotrope Wirksamkeit eines Glykosides ist, umso kleiner ist K_D und umgekehrt (die in die Therapie der Herzinsuffizienz eingeführten Cardenolide wie Strophanthin, Digitoxin und Digoxin haben eine kleine K_D , im Konzentrationsbereich der konventionellen Herzglykoside unwirksame

Herzglycosid	K_D (10^{-8} M)
Digitoxigenin	1,56
Digitoxigenin-mono-digitoxosid	0,33
Digitoxigenin-bis-digitoxosid	0,4
Digitoxigenin-tris-digitoxosid = Digitoxin	0,3
Lanatosid A	0,63
Dihydrodigitoxin	3,78
Digoxigenin	5,7
Digoxigenin-mono-digitoxosid	2,4
Digoxigenin-bis-digitoxosid	0,59
Digoxigenin-tris-digitoxosid = Digoxin	1,0
Digoxigenin-tetra-digitoxosid	2,1
4'''- β -Methyldigoxin	0,75
4'''- β -Acetyldigoxin	0,82
Dihydrodigoxin	57,4
Dihydromethyldigoxin	37,9
Gitoxin	2,28
16-Acetylgitoxin	1,3
Pentaacetylgitoxin	12,3
Lanatosid B	3,24
g-Strophanthin	1,35
K-Strophanthin	1,51
Convallatoxin	0,31
K-Strophanthosid	1,24
Cymarin	2,78

Tab. 1: Dissoziationskonstanten K_D des Glykosid-Rezeptor-Komplexes der $(Na^+ + K^+)$ -aktivierten ATPase aus Rinderhirn. Zwischen der Größe von K_D einerseits und der Bindungsaffinität und inotropen Wirksamkeit der Cardenolide andererseits besteht eine umgekehrte Proportionalität.
(Entnommen: Erdmann, E. et al. (137))

Dihydro-Derivate sind durch eine große K_D entsprechend einer sehr schlechten Affinität gekennzeichnet). In einem Erythrozyten-Testsystem konkurrieren bei simultaner Zugabe mehrerer Glykoside diese um die Rezeptorbindung entsprechend ihrer K_D . Für die Bindung am Rezeptor ist der Lactonring von ausschlaggebender Bedeutung (138, 166, 240, 371, 476). Nach Repke (371) erfolgt die Fixierung an die Membran-ATPase - speziell an ein bestimmtes Areal dieses Enzyms, das als Kaliumzentrum deklariert wird - über eine H-Brückenbindung (Abb. 30). Außer dieser vorrangigen Bindungsstelle, dem Lactonring, den Repke (371) als funktionelle Gruppe bezeichnet, bestehen noch weitere Bindungsstellen über das Steroidgerüst und die Zuckerkette, denen eine unterstützende Bindungsfunktion als sogenannte Haft- und Hilfsgruppen zukommt (Abb. 29) (476). Für eine regelrechte Glykosid-Rezeptorbindung ist eine Mehrpunktfixation des gesamten Cardenolidmoleküls an den Rezeptor anzunehmen, wobei sich das Glykosidmolekül dicht der Membran-

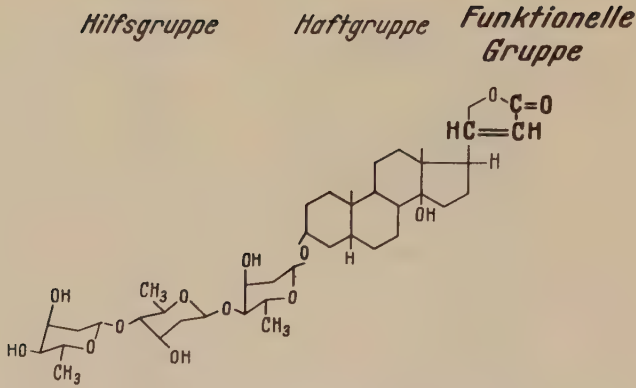


Abb. 29: Unterteilung eines Cardenolidmoleküls nach funktionellen Gesichtspunkten bezüglich seiner Glykosid-Rezeptorbindung. Dem als funktionelle Gruppe bezeichneten Lactonring kommt die größte Bedeutung bei dieser Komplexbildung zu, wahrscheinlich über eine H-Brückenbindung.
(Entnommen: Repke, K. (371))

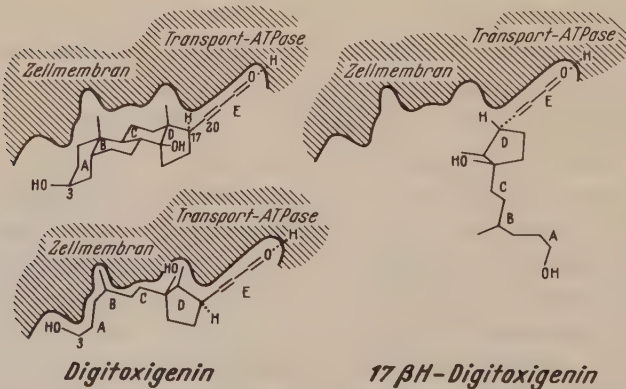


Abb. 30: Hypothetische Vorstellung über die Glykosid-Rezeptorbindung. Die linke Bildhälfte zeigt die schrittweise erfolgende dichte Anlagerung von Digitoxigenin; die primäre Fixation erfolgt über den Lactonring. Die Anlagerung der hydrierten Form des gleichen Aglykons ist dagegen unvollständig, weil die Unterstützung durch die Haftgruppe ausbleibt.
(Entnommen: Repke, K. (371))

ATPase anlegt (Abb. 30). Im Falle einer Veränderung der funktionellen Gruppe, des Lactonringes, durch Stereometrie-änderung - z.B. in α -Stellung - oder durch Sättigung der Doppelbindung - z.B. Dihydro-Verbindungen - wird die Fixierung durch die Haftgruppe negativ beeinflusst (Abb. 30), sodaß nur eine schwache Rezeptor-Glykosid-Bindung mit folglich großer K_D resultiert. Solche Verbindungen haben entsprechend eine schwache oder unwirksame pharmakodynamische Herzwirksamkeit.

Für die Glykosid-Rezeptor-Komplexbildung sind Mg^{++} und ATP erforderlich (411). Während bei Na^+ -Überschuß die Digitalisbindung erhöht ist, verringert K^+ mit steigender Konzentration die Komplexbildung (138,317,369,374,411) - hier besteht eine Konkordanz von klinischer Beobachtung und in vitro-Experiment: eine Hyperkaliämie stellt eine Protektion für Digitalisintoxikationen dar, höhere Digitalisspiegel werden toleriert (252). Ebenso wie K^+ inhibieren auch andere monovalente Ionen die Digitalis-Rezeptorbindung, wenn sie im Überschuß verabreicht werden, so Rb^+ , Cs^+ , Li^+ , NH_4^+ .

Für die Aktivität der Membran-ATPase ist weniger die absolute Na^+ - und K^+ -Konzentration als vielmehr das Ionenverhältnis ausschlaggebend. Diesem Tatbestand ist auch in der Bezeichnung dieses Enzyms als (Na^+-K^+)-aktivierte Membran- bzw. Transport-ATPase Rechnung getragen worden. Überschreitet der Ionenquotient Na^+/K^+ 1, so nimmt die Enzymaktivität ab (411).

Ca^{++} wirken dem K^+ -Effekt entgegen und heben diesen konzentrationsabhängig auf (313); diese experimentelle Feststellung bestätigt den in der Klinik bekannten K^+-Ca^{++} -Antagonismus z.B. für Strophanthin. In Gegenwart von Mg^{++} und ATP nimmt aber die Glykosid-Rezeptorbindung durch Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration nicht wesentlich zu, gemessen an K_D für Strophanthin (138). Ein Mg^{++} -Defizit, wie es unter diuretischer Therapie auftreten kann, begünstigt die Entwicklung von Digitalisintoxikationen (406).

Durch die Hydrolyse eines Moleküls ATP zu ADP und $PO_4^{''}$ wird

die Energie für den Transport von 3 Na^+ aus der Zelle hinaus und von 2 K^+ in die Zelle hinein bereitgestellt (411).

Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierte Membran-ATPase wird gruppenspezifisch durch Herzglykoside proportional ihrer pharmakologischen Wirksamkeit inhibiert (453). Außer den genuinen bzw. derivatisierten Glykosiden besitzen auch andere Naturstoffe (z.B. Erythrophlein), synthetische digitalisartige Verbindungen (z.B. Guanylhidrazone), einige Medikamente (z.B. Suramin, Oligomycin) und SH-blockierende Substanzen diese Hemmeigenschaft auf das Transportenzym (80, 185, 232, 364, 371).

6.1 Digitalisbestimmungsmethoden

Seit der radioaktiven Markierung von Herzglykosiden - anfangs biosynthetisch mit ^{14}C von Digitoxin durch Geiling (160), später in vitro mit ^3H auch von Lanataglykosiden randomisiert nach der Wilzbach-Methode (469) oder selektiv nach den Verfahren von Wartburg (456) und Haberland (193) - konnten in den letzten 20 Jahren grundlegende Erkenntnisse über die Pharmakokinetik verschiedener Herzsteroiden bei Tier und Mensch gewonnen werden (32, 33, 34, 98, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 346, 347, 348, 470). Der Nachweis radioaktiver Verbindungen in Exkrementen und Gewebsextrakten wird mit einer hohen meßtechnischen Empfindlichkeit geführt, beispielsweise im Urin bis zu 30 Tagen nach einer Digoxin-Einmaldosis; jedoch ist wegen des Metabolismus eine chromatographische Aufarbeitung erforderlich, um zwischen der Ausgangssubstanz und Stoffwechselprodukten sowohl qualitativ als auch quantitativ differenzieren zu können (195). Die verabreichten Radioaktivitäten sind zwar klein und die Strahlenbelastung gering, dennoch empfehlen sich am Menschen keine mehrfachen Wiederholungsuntersuchungen. Die Glykosidkonzentration im Serum wird durch Inkorporierung von markierten Herzsteroiden etwas höher bestimmt als mit anderen Nachweisverfahren wie z.B. mit dem RIA (98, 330).

Seit Mitte des vergangenen Jahrzehnts haben Fortschritte der Biochemie die Entwicklung verschiedener Methoden er-

möglichst, die eine quantitative Bestimmung der geringen Herzglykosidkonzentration im Plasma erlauben mit einer z.T. bemerkenswerten Genauigkeit, Sensitivität, Präzision und Reproduzierbarkeit. Mit diesen Methoden, bei denen dem Patienten keine radioaktiven Glykoside appliziert werden müssen und folglich beliebig oft Blutabnahmen für Kontroll- und Verlaufsuntersuchungen erfolgen können, konnten Korrelationen zwischen der derzeit meßbaren Serumdigitaliskonzentration und der pharmakodynamischen Wirkung gesichert werden (29,30,47,384,463,464). Somit ist eine individuelle und objektive Überprüfbarkeit der Digitaliskonzentration im Plasma während der Behandlung einer Herzinsuffizienz gegeben. Mit einem solchen Hilfsparameter kann die geringe therapeutische Breite der Herzglykoside sicherer ausgeschöpft werden, ohne in den toxischen Bereich abzugleiten (139). Bei Herzrhythmusstörungen kann die Serumdigitalisbestimmung zu einem Differentialätiologicum werden (384). Abweichende Serumkonzentrationen bei üblicher Schemadosierung fordern nicht nur zur Dosisänderung, sondern auch zur Beachtung kausaler Zusammenhänge auf wie gestörte Resorption, Medikamentinteraktionen, Niereninsuffizienz, Hypo- und Hyperthyreose, Alter der Patienten oder Bioavailability einer neuen Digoxinspezialität.

Die durchschnittliche therapeutische Serumkonzentration im Pseudoäquilibrium für Digoxin liegt bei 0,5-2 ng/ml (25,37, 42,69 ,77 ,141,151,218,271,350,398). Toxische Konzentrationen sind wegen der geringen therapeutischen Breite der Herzglykoside nur um den Faktor 1,5-3 größer (139). Überlappungen von therapeutischen und toxischen Blutspiegeln haben individuelle Ursachen wie Veränderungen im Elektrolythaushalt, intrazelluläre Elektrolytverschiebung, verschieden großer Verteilungsraum, Affinitätsänderung des Glykosids zum Rezeptor, Qualitätsänderung des kontraktilen Proteins (139), Änderung der Digitalistoleranz. Die mit den nachstehend aufgeführten subtilen biochemischen Methoden meßbaren Serumkonzentrationen sind jedoch nicht in jedem Fall repräsentativ für die in vivo nicht meßbare rezeptorgebundene, pharma-

kodynamisch wirksame Glykosidkonzentration des Myokards. Wegen des Überlappungsphänomens hat eine einzelne Glykosidbestimmung nur eine geringe Aussagekraft, aber als Verlaufsuntersuchung oder im Vergleich mit früheren Konzentrationswerten bzw. in Synopsis mit der klinischen Symptomatik erhöht sich der Informationswert (139). Die neuen Methoden bieten mehr Sicherheit für die Individualtherapie der Herzinsuffizienz.

Experimentelle und z.T. bereits Routineanwendung für die quantitative Digitalisbestimmung im Serum, Urin und in Gewebsextrakten haben insbesondere 6 Verfahren erlangt. Sie lassen sich in direkte und indirekte Bestimmungsmethoden unterteilen (54,69,139):

I. Direkte Bestimmungsverfahren:

1. Gaschromatographie
2. Double isotope dilution derivative Methode
3. Enzymatic isotope displacement assay
4. Radioimmunoassay (RIA)

II. Indirekte Bestimmungsverfahren:

1. Hemmung der ^{86}Rb -Aufnahme von Erythrozyten (^{86}Rb -Test)
2. Hemmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - aktivierbaren ATPase.

Bis auf II/2 sind alle Methoden radioisotopentechnische Verfahren. Außer I/4 erfordern alle Verfahren eine Serumextraktion.

Gaschromatographie: 1963 beschrieben erstmals Jeliffe und Bankenhorn (227) ein gaschromatographisches Verfahren zur Trennung von Digitoxin und Digitoxigenin im Urin. Die Methode basierte auf der Bildung von halogenierten Digitalisderivaten, die im Gaschromatographen analysiert wurden. Dieses gaschromatographische Verfahren zur Differenzierung von Digitalisglykosiden und deren Metabolite, einschließlich Dihydrodigoxin, wurde von 1969 bis 1972 durch Tan (444), Watson, Kalman, Tramell und Clark (458,459,460) weiterentwickelt und auch zur Digoxinbestimmung im Serum angewendet. Das in 10 ml Plasma befindliche Glykosid wird in zahlreichen Reinigungsschritten wie Extraktion, Säulen- und Dünnschichtchromatographie sepa-

riert und gereinigt, zum Genin hydrolisiert und mit Heptafluorbuttersäureanhydrid derivatisiert, wobei durch Absättigung der OH-Gruppen stabile und sublimierbare Fluor-Steroidverbindungen entstehen. Dieses Reaktionsprodukt wird nach dünnschichtchromatographischer Abtrennung der Begleitsubstanzen gaschromatographisch mittels Elektroneneinfangdetektor bestimmt. Zur Verlustberechnung während der Aufarbeitung wird der Plasmaprobe anfangs eine bestimmte Menge ^3H -Digoxin zugesetzt, deren Ausgangs- und Endkonzentration im Liquid-Szintillationszähler gemessen wird.

Wegen des arbeitsintensiven, zeitlichen und apparativen Aufwandes hat diese Methode keinen Einzug in das klinische Routinelabor gefunden, obgleich sie eine relativ hohe Nachweisempfindlichkeit von 0,2 ng/ml Plasma hat.

Double isotope dilution derivative Methode: 1964 beschrieben Lukas und Peterson (296,297) diese Methode zur Bestimmung von Dig~~it~~oxin im Plasma. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht in der in vitro radioaktiven Markierung der nachzuweisenden Substanz. Der Methylenchloridextrakt von 10 ml Plasma wird papierchromatographisch von Begleitsubstanzen gereinigt und mit ^{14}C -Essigsäureanhydrid in einem Benzol-Pyridin-Gemisch für 4 Tage inkubiert, wobei ^{14}C -Digitoxinacetat entsteht. Die ^{14}C -Radioaktivität des Reaktionsproduktes wird nach nochmaliger papierchromatographischer Reinigung mit verschiedenen Laufmitteln zusammen mit dem zu Beginn der Analyse zugesetzten ^3H -Digitoxin zur Korrektur des Digitalisverlustes während der Arbeitsprozedur in einem Liquid-Szintillationspektrometer gemessen und auf diese Weise der Digitoxingehalt der Plasmaprobe eruiert. Die Nachweisempfindlichkeit von anfangs 1 ng/ml konnte inzwischen verbessert werden, sodaß jetzt auch Digoxin, Digoxigenin und Digitoxigenin im Serum, in Exkrementen und aus Geweben quantitativ bestimmt werden können (300). Somit können mit dieser Methode Digitoxinmetabolite differenziert und die Methode für Stoffwechselstudien eingesetzt werden, ohne die Probanden mit radioaktiv markierten Glykosiden zu be-

lasten. Das Verfahren konnte wegen des beachtlichen Zeitaufwandes nicht über die Forschung hinaus in der klinischen Routine eingeführt werden.

Enzymatic isotope displacement assay: Dieser Test wurde von Brooker und Jeliffe 1969 beschrieben (61,62). Er beruht auf der konkurrierenden Bindung von Herzglykosiden an der Membran-ATPase von Säugetieren. Der eingedampfte Chloroformextrakt von 5 ml Serum wird in Toluol-Trispuffer aufgenommen. Nach Verdampfen des Toluols wird mit einer kleinen Menge ATPase aus Meerschweinchenhirn und einer bestimmten Menge ^3H -Ouabain als Indikator 1/2 bis 1 Stunde inkubiert. Nach Zentrifugation wird die ^3H -Radioaktivität des Überstandes im Liquid-Szintillationszähler gemessen und aus dem Defizit zur ^3H -Ouabainvorgabe der Glykosidgehalt des Serums berechnet; es besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem ungebundenen ^3H -Ouabaingehalt des Überstandes und der Digitaliskonzentration im Serum.

Wenn auch für diese Methode eine Serumextraktion erforderlich ist, so empfiehlt sich dieses Verfahren dennoch für die klinische Laborroutine, und zwar wegen seiner günstigen Nachweisempfindlichkeit von 0,5 ng/ml Digitoxin oder Digoxin und der relativ kurzen Arbeitszeit. Ein anderer Vorteil liegt im Prinzip: nur die biologische Wirkung von Herzglykosiden und ihrer kardioaktiven Metabolite wird über die spezifische Digitalisbindung am Rezeptor der Membran-ATPase nachgewiesen. Entsprechend ihrer pharmakologischen Wirkung am Herzen verdrängen - wie experimentell nachgewiesen werden konnte (139) - die verschiedenen Herzsteroido quantitativ unterschiedlich das tritierte g-Strophanthin aus seiner spezifischen Rezeptorbindung. Dieser Assay bietet sich auch bei Einnahme eines unbekannten Herzglykosids im Falle einer Intoxikation ohne eruierbare Anamnese an, das Ausmaß der Rezeptorsättigung zu messen und somit auf die Quantität der Intoxikation zu schließen (139).

Hemmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -aktivierbaren ATPase: Dieses Verfahren basiert wie der ^{86}Rb -Uptake-Test auf der spezifischen Hemmung

der Membran-ATPase durch alle herzwirksamen Steroide und ihrer Metabolite. Entsprechend ist auch die Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat inhibiert. Bestimmt wird das freie Phosphat; aus dessen vermindertem Anfall wird die Digitaliskonzentration der Serumprobe ermittelt. Das Verfahren wurde erstmals von Burnett und Conklin 1968 beschrieben (66) und von anderen Untersuchern bestätigt (36, 320).

5 ml Serum werden mit Methylenchlorid extrahiert. Der Extrakt wird verdampft, der Rückstand in eine gepufferte Elektrolytlösung, die Membran-ATPase aus Schweine- oder Rinderhirn enthält, aufgenommen. Nach einer kurzen Vorinkubation wird eine bestimmte Menge ATP zugesetzt und für 15 Minuten inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird mit einer eiskalten verdünnten Trichloressigsäure gestoppt und das entstandene freie Phosphat bestimmt. Arbeits- und Zeitaufwand sind gering, die apparative Ausrüstung ist nicht groß. Die untere Nachweisgrenze der Originalmethode liegt bei 1 ng/ml, sodaß das Verfahren nur für Digoxinbestimmungen geeignet ist - für Digoxinbestimmungen müßte von einem größeren Serumvolumen ausgegangen werden (31).

Hemmung der ^{86}Rb -Aufnahme von Erythrozyten (^{86}Rb -Test):

Nachdem die Hemmung des transmembranären $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Transportes durch Herzglykoside in bereits hohen Verdünnungen auch für Erythrozyten erkannt (418) und der Beweis für die Ersetzbarkeit von K^+ durch andere monovalente Kationen wie z.B. durch Rb^+ aus der gleichen chemischen Gruppe der Alkali-elemente erbracht werden konnte (291), inaugurierte 1965 Lowenstein (292) eine Methode zur Bestimmung von Serumdigitaloxinkonzentrationen. Die Einführung eines Extraktionsschrittes verminderte den Einfluß von interferierenden Serumbestandteilen und erhöhte die Sensitivität des Testes (293), sodaß auch andere Herzsteroiden bestimmt werden konnten. Die Nachweisempfindlichkeit der Methode liegt je nach Modifikation für Digitoxin und Digoxin bei 0,2-0,5 ng/ml; somit können auch therapeutische Digitalisspiegel quanti-

tativ erfaßt werden.

1-10 ml Plasma (28,31,37,165,170,293) werden mit Methylenchlorid extrahiert, der Extrakt verdampft, der Rückstand mit isotoner NaCl- oder Pufferlösung aufgenommen und zusammen mit einer bestimmten Menge von ^{86}Rb und gewaschenen Erythrozyten inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Erythrozyten wird die von ihnen aufgenommene ^{86}Rb -Radioaktivität im Liquid-Szintillationscounter oder im Bohrlochzähler gemessen und an Hand von simultan präparierten Eichstandards auf die Serumkonzentration geschlossen.

Der ^{86}Rb -Test ist arbeits- und zeitaufwendiger als der RIA, hat aber wie der Enzymatic isotope displacement assay und der Hirn-ATPase-Hemmtest den Vorteil der Registrierung nur der biologischen Wirkung der zu bestimmenden Herzglykoside und ihrer Metabolite, sofern diese wie die Primärsubstanz kardioaktive Eigenschaften besitzen. Der ^{86}Rb -Test ist nahezu universell; er kann für jedes Herzglykosid angewendet werden, sofern dieses genügend lipophil ist, um mit organischen Lösungsmitteln extrahiert zu werden (31,69,139). g-Strophanthin z.B. ist nur gering in Chloroform oder Dichlormethan löslich und deshalb seine Bestimmung aus dem Serum mit der ^{86}Rb -Methode nicht indiziert (31,195). Insofern ist die Universalität dieses Testes durch die Unsicherheit, hydrophile Herzglykoside und wasserlösliche kardioaktive Metabolite bei der Serumextraktion zu erfassen, eingeschränkt (177) - das gilt jedoch nicht für Glykosid-Modellstudien.

Radioimmunoassay (RIA): Dieser Test vereinigt in sich sowohl das Prinzip der Antigen-Antikörper-Komplexbildung als auch das der Radioisotopenverdünnung. Der RIA zur Digitalisbestimmung ist entsprechend dem RIA für die Insulinbestimmung nach Yalow und Berson (474) entwickelt worden. Die ersten Anwender des Digitoxin- und Digoxin-RIA waren 1968 Oliver et al. (349) und 1969 Smith et al. (398). Benötigt werden ein Antiserum mit ausreichend hoher Spezifität gegen das jeweilige Herzsteroid und das gleiche markierte Glykosid mit genügend hoher spezifischer Radioaktivität. Die radio-

chemische ^3H -Markierung kann als Random-Markierung nach Wilzbach (469) oder als selektive nach von Wartburg (456) oder Haberland (193,194) erfolgen; eine biosynthetische Markierung mit z.B. $^{14}\text{CO}_2$ ergibt zu geringe spezifische Radioaktivitäten (160,161). Für die Erzeugung von Antidigitalis-Antikörpern bei Kaninchen oder Schafen ist, da die Herzglykoside mit einem zu kleinen Molekulargewicht nur Haptene sind, eine kovalente Kopplung an Proteine eine *conditio sine qua non*. Diese Kopplung mit Albumin wird z.B. über eine Perjodatoxydation des Glykosids und Natriumborohydrid (140) oder über eine Succinylderivatisierung der Genine (349) erreicht (96, 400). Antiseren werden gegen Digitoxin, Digoxin und g-Strophanthin erzeugt.

0,05-1 ml Patientenserum wird im Doppelansatz zusammen mit bestimmten Mengen markierten Glykosids und Antiserum für durchschnittlich 30 Minuten inkubiert, danach der nichtgebundene Tracer abgetrennt - meistens durch Dextran-Charcoal, Doppelantikörper oder durch Ausspülen der Solid-Phase-RIA - und die gebundene Radioaktivität gemessen. An einer mit jeder Testdurchführung zu erstellenden Eichkurve wird die Digitaliskonzentration für die vorgegebene Serumprobe abgelesen; es besteht entsprechend der Kompetition eine umgekehrte Proportionalität zwischen der gemessenen Radioaktivität und dem Glykosidgehalt im Patientenplasma.

Der RIA als Methode ohne Serumextraktion hat eine gute Reproduzierbarkeit und hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze z.B. von weniger als 0,1 ng/ml für Digoxin; deshalb genügen bereits geringe Ausgangsmengen von Patientenserum. Mit dem RIA können auch die Glykosidkonzentrationen im Urin und in Gewebsextrakten bestimmt werden.

Die relativ einfache Durchführbarkeit, der geringe Zeit- und apparative Aufwand lassen den RIA zunehmend zu einer Routine-methode im klinischen Labor werden, zumal auch die Industrie bereits konfektionierte Kits anbietet.

Gegenüber dem ^{86}Rb -Test, der ATPase-Hemmung und dem Enzymatic isotope displacement assay wird mit dem RIA keine biologische Wirksamkeit, sondern eine immunologische Struktur-

spezifität erfaßt. Da die Antikörperspezifität auf das Steroidgerüst gerichtet ist, werden auch biologisch unwirksame Metabolite wie z.B. das Dihydrodigoxin mitbestimmt; da der Metabolitenanteil im Blut aber klein ist, ist mit einer ernstlichen Verfälschung der Digoxinspiegelbestimmung u.E. nicht zu rechnen. Kreuzreaktionen mit anderen Herzglykosiden oder Steroidhormonen (128,263) bzw. steroidartigen Medikamenten wie z.B. Spironolactone (41,220,250,355) sind beobachtet worden, sodaß Greeff (177) resümmierend feststellen konnte: "Bei der radioimmunologischen Methode wiederum erfaßt man mehr oder weniger alles, was Steroidnatur hat, und man benötigt den jeweils passenden Antikörper ausreichender Spezifität und das entsprechende markierte Glykosid".

Aus der umfangreichen Literatur der letzten Jahre über RIA zur Herzglykosidbestimmung sollen nachfolgend einige wesentliche Erkenntnisse rapportiert werden. Die Qualität des Antiserums ist von wesentlicher Bedeutung für den RIA; von ihr hängt die Größe der ermittelten Glykosidkonzentration ab (139). Bei der Immunisierung entsteht ein Spektrum von Antikörpern mit enger und breiter Spezifität. Kommerzielle Seren sind Antikörpergemische mit folglich unterschiedlicher Qualität (274); mit ihnen können z.T. divergierende Resultate gewonnen werden. Zur Spezifitätsbeurteilung muß die Kreuzreagibilität mit verschiedenen Steroiden getestet werden. Die Affinitätskonstante eines Antiserums ist mittels Gleichgewichtsdialyse prüfbar (55); verschiedene handelsübliche Antiseren zeigen niedrige Affinitätskonstanten. Die Bindungskapazität eines Antiserums ist beurteilbar durch Anfertigung einer Sättigungskurve, indem einer konstanten Menge radioaktiv markierten Glykosids steigende Dosen Antiserum zugeführt werden; gemessen wird der Überstand an nicht gebundenem Glykosid. Als Parameter der Bindungskapazität dient jene Antiserummenge, bei der 40-50% des vorgegebenen Glykosids gebunden werden (440). Die Bindungskapazität desselben Antiserums mit der gleichen Menge fällt in verschiedenen digitalfreien Probanden-Plasmaproben unterschiedlich aus, wie

mittels Bindung konstant vorgegebener markierter Glykosiddosis bewiesen werden konnte (440); es ergab sich ein V_k für Einzelseren von $\pm 11\%$, für Poolserum von $\pm 5\%$ (440) bzw. $\pm 7\%$ (274). Auf diesem individuellen unspezifischen Serum-effekt auf die Bindungskapazität des Antiserums beruht die Fehlanzeige von Digitalis in manchen Seren von Patienten, die nicht mit Herzglykosiden oder strukturverwandten Medikamenten behandelt worden sind. Negative Digitaliskonzentrationen werden dann angezeigt, wenn die Bindungskapazität in der untersuchten Plasmaprobe größer ist als im Kontrollserum. Diese Abweichungen von $\pm 5-10\%$ für das Leerserum als Bezugs-wert, zuzüglich der Intraassay-Variation als Bestimmungs-fehler in etwa der gleichen Größenordnung, können zu einem beachtlichen Gesamtfehler führen, sodaß die Glykosidbe-stimmungen niedriger Serumkonzentrationen von $0,1-0,3$ ng/ml unsicher werden trotz primär hoher Sensitivität der RIA (440). Diese geringen Glykosidspiegel sind aber für die Therapie irrelevant, da sie z.B. für Digoxin im subtherapeutischen Bereich liegen (durchschnittlicher optimaler therapeutischer Bereich $0,5-2,0$ ng/ml). Je kleiner das vorgegebene Serum-volumen ist, umso größer kann der Analysenfehler werden; es wird daher empfohlen, möglichst von 1 ml Patientenserum auszugehen (274). Zusammengehörige Proben einer Serie sollten möglichst in einem Analysengang, d.h. in ein und demselben Testansatz bestimmt werden; dadurch konnten die Abweichungen bis auf $3-4\%$ gesenkt werden (274). Die Interassay-Variation kann wesentlich größer sein. Die Spezifität der Antikörper schwankt in Abhängigkeit von den sie induzierenden Immuno-genen; sie ist in der Regel hoch bei Digoxin- und Digitoxin-antikörpern und geringer bei g -Strophanthin- und Convallato-xinantikörpern, daher werden bei den letzteren häufiger Kreuzreaktionen beobachtet (440). Kreuzreaktionen von Digi-toxin mit Digoxinantikörpern zeigen eine wesentlich schwächere Bindung des Digitoxins, obgleich sich beide Gly-koside nur durch eine OH-Gruppe am C_{12} -Atom des Steroid-kerns unterscheiden (254,258,263,274); wir fanden in 4 ver-schiedenen kommerziellen Digoxin-RIA einen Digitoxin-Nachweis

von 8-12% für mittlere und niedrige Serumkonzentrationen (335). Wesentlich kleiner ist die Digitoxinbindung in Gegenwart von Digoxin - hier überwiegt die Affinität der gegen Digoxin induzierten Antikörper zu diesem Glykosid; Digitoxin mußte bis zu einem 1000-fachen Überschuß zugesetzt werden, um das Digoxin aus seinen Bindungsstellen zu verdrängen (440).

Substitutionen an der Zuckerkette stören die Hapten-Antikörper-Reaktion im RIA nicht. So ergeben mit dem gleichen Antiserum Acetyl- und Methylidigoxin in äquimolaren Konzentrationen die gleichen Bestimmungsergebnisse wie Digoxin (271, 272, 440); die Bindungskurven aller 3 Glykoside entsprechen sich (Abb. 31). Wasserlösliche Metabolite mit Glucuronierung an der Zuckerkette dürften wie das primäre Glykosid gleichermaßen bestimmt werden; eine Glucuronsäuresubstitution am Steroidkern dürfte dagegen eine Hapten-Antikörperkomplexbildung nicht zustande kommen lassen (274, 440). Digoxingenin wird schwächer gebunden vom Digoxinantiserum als Digoxin (272) - z.B. nur 29% (440); das gleiche gilt für 3-Epi-Digoxingenin (272). Die Hapten-Antikörperreak-

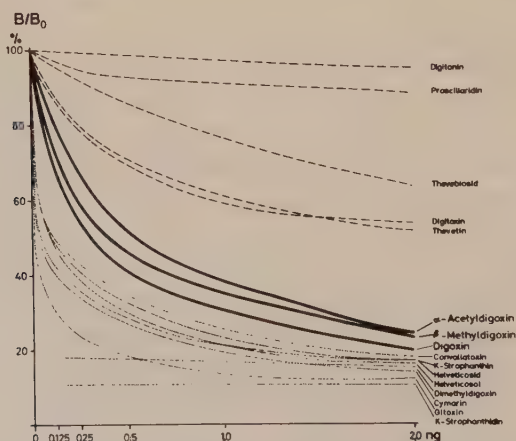


Abb. 31: Kompetitionskurven mit verschiedenen Herzglykosiden, erstellt mit dem ^3H -Digoxin-RIA B₁. Auch mit anderen Glykosiden als nur mit Digoxin geht das Antiserum Kreuzreaktionen ein. (Die Kollektion von Herzglykosiden verdanken wir Herrn Dr. F. Kaiser, Fa.Boehringer, Mannheim).

tion läuft relativ schnell und weitgehend temperaturunabhängig ab; Reaktionen bei 4,18 und 37°C ergaben im Rahmen der Streuung liegende entsprechende Resultate (440).

Die Dauer der Tierkohleeinwirkung zur Separierung der freien von der gebundenen Radioaktivität beeinflusst stark die Resultate über eine ständige Reäquilibration (128,220,417, 477); eine 30-minütige Charcoalinkubation reduziert die gebundene Radioaktivität gegenüber dem 5-Minutenwert um 17% (440), eine 1-stündige sogar bis um 60% (353). Ebenso ist die Menge der Tierkohle von Einfluß: 0,2 ml Charcoalsuspension ergab im Überstand eine um 44% höhere Radioaktivität als 1,0 ml (440). Daraus resultiert die Notwendigkeit einer Standardisierung der Separationsprozedur. Die Sensitivität des RIA hängt primär von der spezifischen Aktivität des markierten Glykosides ab; je höher diese ist, umso niedriger liegt die untere Nachweisgrenze. Chemische Verunreinigungen des Tracers und des unmarkierten Standarddigoxins sind nur in Hinsicht auf Glykoside mit analogem Steroidkern wegen Kreuzreaktionen von Einfluß. Radioaktive Verunreinigungen erhöhen lediglich die Backgroundaktivität (440), und zwar nur bei den RIA mit Charcoaltechnik, nicht aber bei Solid-phase-RIA, weil bei letzteren der Überstand verworfen wird und die Reaktionsröhrchen nachgewaschen werden (331).

Trotz der unsicheren Digitalisbestimmung bei einer Serumkonzentration unter 0,3 ng/ml wegen unspezifischer Serumeinflüsse und trotz verschiedener Störanfälligkeiten durch Kreuzreaktionen mit anderen Herzglykosiden, Steroidhormonen und strukturähnlichen Medikamenten, durch die Charcoaltrenntechnik, Fremdradioaktivität (8,67,68,75 ,417), Quencheffekte (8,41,67,68,75) und Hypalbuminämie (220) ist der RIA die für das klinische Routinelabor empfehlenswerte Methode zur Kontrolle der Therapie und Bioavailability sowie zur Differenzierung einer suspekten Digitalisintoxikation.

6.2 Prinzip des RIA

Radioimmunologische Tests finden zunehmend Eingang in Laboratorien, Kliniken und auch Praxen. Kommerziell werden bereits verschiedene Radioimmunoassays (RIA) als gebrauchsfertige Kits für die Bestimmung von Hormonen, Plasmaproteinen, Enzymen, Vitaminen, Antigenen und Arzneistoffen angeboten (329). Einige Kits sind relativ leicht zu handhaben und liefern in verhältnismäßig kurzer Zeit die gewünschten Untersuchungsergebnisse, andere wiederum sind aufwendig und verlangen eine minutiöse Arbeitsweise mit exakter Einhaltung von Reaktionszeit, Temperatur, Ionenstärke, pH etc.

RIA zählen zu den empfindlichsten, spezifischsten und auch genauesten Analyseverfahren. Die hohe Sensitivität ermöglicht in vitro-Messungen von 10^{-9} bis sogar 10^{-18} g. Damit ist der RIA erheblich empfindlicher als biologische Tests.

Im RIA sind die Prinzipien der immunologischen Antigen-Antikörper-Reaktion, d.h. hohe Spezifität und Empfindlichkeit, mit der Radioisotopenverdünnungsanalyse vereint (Abb. 32).

Radioaktiv markiertes und nicht markiertes Antigen bzw. Hapten, die sich in ihren immunogenen Eigenschaften nicht unterscheiden, konkurrieren um die Bindung mit einem spezifischen Antikörper zu einem markierten oder unmarkierten Antigen-Antikörperkomplex (Gleichung 1 der Tabelle 2).

Die Grundlagen des RIA wurden erstmals von Yalow und Berson anhand der Insulinbestimmung im Serum beschrieben (473). Bei konstanter Konzentration an markiertem Antigen und Antikörper kommt es bei ansteigenden Konzentrationen von unmarkiertem Antigen, das aus Standardlösungen für die Eichkurve oder aus Patientenserum stammt, zur Abnahme der an den Antikörper gebundenen Radioaktivität. Im Zustand des chemischen Gleichgewichtes gehorcht die Reaktion dem Massenwirkungsgesetz.

Die Gleichgewichtskonstante K ist der Quotient der beiden Reaktionsgeschwindigkeiten k_{+1} und k_{-1} für die Assoziation und Dissoziation des Antigen-Antikörper-Komplexes (Gleichung 2 der Tabelle 2). Das Verhältnis B/F des gebundenen (B) zum freien Antigenanteil (F) ist eine lineare Funktion von K (Gleichung 4 der Tabelle 2). Diese mathematische Linearität

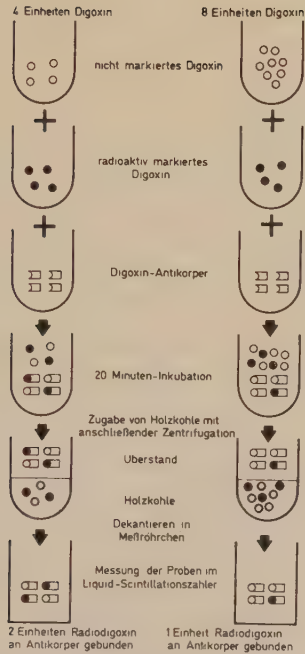
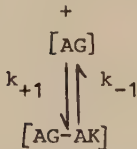
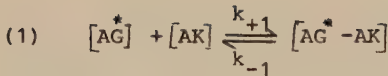


Abb. 32: Prinzip des Radioimmunoassays am Beispiel eines Digoxin-Radioimmunoassays (^3H -RIA A₁). Das Schema demonstriert die einzelnen aufeinander folgenden Arbeitsgänge und Reaktionsschritte. Die rechte vertikale Reihe zeigt im Vergleich zur linken die Bestimmung der doppelten Menge an Digoxin; dabei wird am Ende der Reaktion weniger radioaktives Digoxin in der Probe gemessen.

wird aber durch die Heterogenität der Antiseren eingeschränkt, die Gemische von Antikörpern sind, deren Bindungsstellen unterschiedliche Affinitäten aufweisen. Die zu messende Antigen- bzw. Hormonkonzentration $[H]$ beeinflusst das Verhältnis B/F invers; d.h. mit Zunahme von $[H]$ wird B/F kleiner und umgekehrt (Gleichung 5 der Tabelle 2) (Abb. 33). B/F ist der entscheidende Parameter im RIA. Ist $[H]$ sehr viel kleiner als $[AB^0]$, d.h. ist die Konzentration der Bindungsstellen vergleichsweise sehr hoch, dann ist eine Änderung von B/F kaum



$$(2) \quad K = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[AG-AK]}{[AG][AK]}$$

$$[AG] = F$$

$$[AG-AK] = B$$

K = Gleichgewichts-
konstante

$$(3) \quad [AB^O] = [AK] + [AG-AK]$$

$[AB^O]$ = mol. Konzentration der Bindungsstellen des AK

$$K = \frac{B}{F([AB^O] - B)}$$

$$(4) \quad B/F = K([AB^O] - B)$$

$$B = b[H]$$

$[H]$ = unbekannte Hormonkonzentration

$$B/F = b/(1-b)$$

$$(5) \quad B/F = K([AB^O] - b[H])$$

b = Anteil der gebundenen H-Konzentration

$$B/F = 1, [H] \rightarrow 0$$

$$(6) \quad K[AB^O] \geq 1$$

$$[AB^O] = [H]$$

$$K[H] \geq 1$$

$$(7) \quad K \geq \frac{1}{[H]}$$

Tab. 2: Mathematische Beschreibung des RIA in Anlehnung an Yalow und Berson (473), ausgehend vom Massenwirkungsgesetz.

registrierbar. In diesem Falle muß durch Verdünnung des Antiserums (Titerbildung) die Bindungsstellenkonzentration so weit herabgesetzt werden, daß diese nicht viel größer ist als die molare Konzentration des zu bestimmenden Antigens

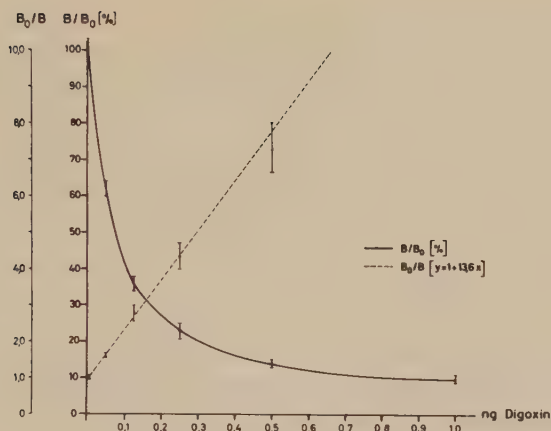


Abb. 33: 2 verschiedene Darstellungsmöglichkeiten von Eichkurven für einen Digoxin-RIA: einmal in Form einer Hyperbel als Quotient des gebundenen Tracers bei Anwesenheit von nicht markiertem Digoxin (=Standard-Digoxin) zum maximal durch den Antikörper koppelbaren Anteil markierten Digoxins, ein andermal in Form einer Geraden bei Umkehrung des genannten Verhältnisses. Mit wachsender Konzentration unmarkierten Digoxins (Abszisse) fällt umgekehrt der gebundene Anteil markierten Digoxins (Ordinate). Gewinnung der Daten durch Dreifachbestimmung verschiedener Standard-Digoxinkonzentrationen mit dem ^3H -Digoxin-RIA B_1 .

bzw. Hormons. Für geeignete Antiserumverdünnungen wird $B/F = 1$. Unter Vernachlässigung der geringen Konzentration des markierten Antigens wird für verschwindend kleine Antigenkonzentrationen das Produkt von K und der Bindungsstellenkonzentration 1 (Gleichung 6 der Tabelle 2). Ist im anderen Falle die gesuchte Antigen- bzw. Hormonkonzentration gleich der Konzentration der Bindungsstellen, dann ist K dieser Konzentration reziprok (Gleichung 7 der Tabelle 2).

Bei vorgegebener Antigen- bzw. Hormonkonzentration bestimmt die Bindungskonstante K den Quotienten B/F (Gleichung 5 der Tabelle 2). Sensitivität und Präzision - 2 wesentliche Kenngrößen eines radioimmunologischen Systems - hängen von diesem Quotienten und damit auch von K ab.

Voraussetzungen für einen RIA sind:

1. Hochgradige Reinheit des Antigens
2. Gewinnung eines Antiserums mit spezifischen Antikörpern
3. Radioaktive Antigen- bzw. Hormonmarkierung mit hoher spezifischer Aktivität
4. Trennmethode mit möglichst geringer Störanfälligkeit und ohne Beeinflussung der primären Bindungsreaktion zur Separierung des freien vom gebundenen Tracer.

Ad 1: Antigen: Ein hochgradig gereinigtes Antigen ist Voraussetzung für die radioaktive Markierung und für die Standardlösungen für die Eichkurve. Eine schonende Reinigung und Separierung des Antigens bzw. Hormons wird meistens säulenchromatographisch erreicht.

Ad 2: Antikörper: Die meisten Proteohormone sind genügend immunogen und liefern normalerweise geeignete Antiseren, wenn sie als Emulsion in komplettem Freund'schem Adjuvans an Laborieren appliziert werden. Schwieriger gestaltet sich die Produktion von Antiseren gegen Peptid- und Steroidhormone. Die Erzeugung eines geeigneten Antikörpers gelingt hier erst nach Kopplung des betreffenden Antigens bzw. Haptens an ein Trägerprotein wie z.B. Rinderserumalbumin (264,356,445). Mehrere Immunisierungen und Booster-Injektionen sind in der Regel für die Induktion von spezifischen Antikörpern erforderlich. Wichtiger als der Titer, d.h. die Antikörperkonzentration, ist die Gleichgewichtskonstante K.

Ad 3: Tracer: Radioaktiv markierte Steroide, bei denen H- oder C-Atome durch ^3H - oder ^{14}C substituiert sind, sind mit geeigneter spezifischer Radioaktivität kommerziell erhältlich bzw. in den Kits enthalten. Die ^3H -Markierung kann ungezielt nach der Wilzbach-Methode (469) oder gezielt erfolgen (456). Tritium hat eine physikalische $t/2$ von 12,26 Jahren und eine ausschließliche β -Emission mit einer maximalen Energie von 18,6 keV; zu seiner Radioaktivitätsmessung ist ein Flüssigkeitsszintillationszähler erforderlich. Die Markierung mit Radiojod hat gegenüber Tritium meßtechnische Vorteile;

aufgrund der γ -Emission kann die Radioaktivitätsmessung im Bohrlochzähler ohne weitere zusätzliche Aufbereitung der Proben erfolgen. Die Markierung mit ^{125}J wird der mit ^{131}J vorgezogen wegen der längeren physikalischen $t/2$ von 60,2 Tagen und der größeren Zählausbeute bei der niederenergetischen γ -Emission von 35 keV (Abb. IV). Da in Steroide, einschließlich Digitalisglykoside, Radiojod direkt nicht eingefügt werden kann, sind Hilfsgruppen wie z.B. Tyrosin nötig (Abb. V).

Eine chemische Reinheit des betreffenden Antigens bzw. Hormons von mindestens 90% ist Voraussetzung für die Markierung. Die Radiojodmarkierung erfolgt meistens mit der Chloramin-T-Methode nach Greenwood (183), wobei das Radiojodion oxidiert und in die Orthostellung des Benzolringes von Tyrosin gebracht oder auch in Histidin eingebaut wird. Schonende Radiojodmarkierungen können enzymatisch (219) oder mittels der Konjugationsmethode (56), bei der ein ^{125}J -Acylierungsmittel verwendet wird, ausgeführt werden. Eine hohe spezifische Aktivität wird angestrebt für eine hohe Empfindlichkeit des RIA; jedoch können sehr große Markierungsraten zu einer Abnahme der immunologischen Affinität führen (414). Als praktikabel hat sich eine spezifische Aktivität von 30-300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Substanz erwiesen. Die chemische Konzentration des markierten Antigens wird ebenfalls zur Gewährleistung einer hohen Sensitivität der Methode kleiner gewählt, als die geringste Konzentration des zu bestimmenden unmarkierten Antigens bzw. Hormons im Patientenserum beträgt. Für jeden RIA müssen die spezifische Aktivität und der Antiserumtiter optimiert werden.

Ad 4: Trennmethoden: Am Ende jedes radioimmunologischen Verfahrens steht die Messung der Radioaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes bzw. des nicht umgesetzten Tracers oder beider Anteile. Bei den meisten RIA kommt es nicht zur spontanen Präzipitation der gebildeten Immunkomplexe. Spezielle Separationsverfahren sind deshalb entwickelt worden (Tab. I). Die Auswahl des geeigneten Trennsystems beeinflusst wesentlich die Qualität des betreffenden RIA. An ein ideales Separationsverfahren sind folgende Anforderungen zu stellen:

1. Vollständige Trennung der beiden Komponenten, d.h. freier und gebundener Tracer, ohne Beeinflussung der primären Bindungsreaktion. Diese Forderung ist wichtig für die Sensitivität und Präzision eines RIA.
2. Einfache, schnelle, möglichst auch billige Trennung mit üblichen Laboreinrichtungen. Diese Anforderung ist eine Voraussetzung für eine routinemäßige Anwendung und Automatisierung.
3. Keine Beeinflussung der Trennung durch unspezifische Faktoren im Plasma oder Serum.

Bei den meisten RIA zur Digitalisbestimmung wird für die Separation des ungebundenen vom gebundenen Tracer Dextran-Charcoal verwendet; aber auch Doppelantikörper- (264) und Solidphase-Methoden (252,331) sind jüngst entwickelt worden. Eine Erleichterung und Beschleunigung der nach der Radioaktivitätsmessung erforderlichen Berechnung der Ipm-Daten kann mittels elektronischer Datenverarbeitung (EDV) erfolgen, wofür in der gegenwärtigen Entwicklung verschiedene mathematische Modelle aufgestellt und auch erprobt worden sind (81,314,385,386,451). Für die Computerbearbeitung eignen sich derzeit am besten RIA mit Charcoal- oder Doppelantikörpertrenntechnik (414).

Die Richtigkeit der RIA-Daten muß durch eine konsequente Qualitätskontrolle in Form der Reproduzierbarkeit von Kontrollserien und der Wiederfindung gesichert werden (76,385). Die Überprüfung der Richtigkeit der nach den Standards erstellten Eichkurve kann an einer mathematischen Idealkurve unter Berücksichtigung von B/B_0 (Verhältnis des bei Anwesenheit von unmarkiertem Antigen gebundenen Anteils von markiertem Antigen zum maximal vom Antikörper koppelbaren markierten Antigen) und der pro Ansatz zugegebenen Radioaktivität erfolgen (104).

6.3 RIA zur Digitalisbestimmung

Nachdem 1967 Butler und Chen (68) erstmals bei Kaninchen An-

tikörper gegen an Rinderalbumin gekoppeltes Digoxin erzeugen konnten, begann die Entwicklung von Digoxin- und Digitoxin-RIA. Die ersten Berichte über derartige radioimmunologische Digitalisbestimmungen im menschlichen Serum stammen 1968 von Oliver, Parker und Brasfield (349) und 1969 von Smith, Butler und Haber (398); die erste Autorengruppe widmete sich vorwiegend der Digitoxinbestimmung mittels radiojodiertem Succinyl-digitoxigenin als Tracer, das zweite Autorenteam der Digoxinbestimmung mittels tritiertem Digoxin als markiertem Hapten. Die in den darauffolgenden Jahren erschienenen Publikationen befaßten sich mit klinischen Erhebungen, wonach sich mit allerdings breiter Überlappung therapeutische und toxische Konzentrationsbereiche abstecken ließen (Tab. 3). Methodische Variationen betrafen die Verschiedenheit der ^{125}J -Markierung des Digoxins bzw. Digoxigenins (Abb. V) (184, 221, 264), der Trennung des freien vom gebundenen Tracer anstatt Dextran-Charcoal mit Albumin-Charcoal (263), Gelatine-Charcoal (60), Polyäthylenglykoll (11), Doppelantikörper (264), ZnSO_4 (Somogyi-Präzipitation) (319), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (128) und Solid-phase (252, 331). Der Einsatz eines ^{125}J -Tracers mit hoher spezifischer Radioaktivität (500 Ci/mMol) und eines Antiserums mit 60%er Bindungskapazität ermöglichte eine Schnellbestimmung von Digoxin innerhalb von 30 Min. (184).

7.1 Eigene Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Digoxin-RIA

Die geringen Serumdigoxinkonzentrationen im therapeutischen Bereich von etwa 0,5-2,0 ng/ml und der bereits bei der doppelten Konzentration beginnende toxische Bereich mit breiter Übergangszone zwischen beiden Konzentrationsbereichen erfordern eine exakte quantitative Digoxinbestimmung. Voraussetzungen für diese Untersuchungen sind eine hohe Empfindlichkeit des RIA und eine gute Reproduzierbarkeit der Meßwerte. Wir wandten uns deshalb methodischen Fragen zu, insbesondere der Qualitätskontrolle und Vergleichbarkeit einiger

	ther.Konz.	tox.Konz.	Signif.
	$\bar{x}$ (ng/ml)	$\bar{x}$ (ng/ml)	
Beller et al. (25)	1,0	2,3	+
Chamberlaine et al. (77)	1,4	3,1	+
Evered et al. (141)	1,4	3,3	+
Fogelman et al. (151)	1,4	1,7	-
Grosse-Brockhoff et al. (188)	1,7	3,3	+
Hoeschen et al. (218)	1,1	2,8	+
Johnston et al. (236)	1,0	3,1	+
Lader et al. (263)	1,1	2,2	+
Larbig et al. (271)	1,5	4,1	+
Morrison et al. (325)	0,8	3,3	+
Oliver et al. (350)	1,6	3,0	+
Smith et al. (398)	1,3	3,3	+
Strobach et al. (439)	1,4		
Zeegers et al. (477)	1,6	4,4	+
$\bar{x}$	1,3	3,1	

Tab. 3: Zusammenstellung der in der Literatur mitgeteilten Mittelwerte für Digoxin-Serumkonzentrationen bei optimal mit verschiedenen Digoxindosen eingestellten und überdigitalisierten unterschiedlich großen Patientenkollektiven mit entsprechender klinischer Intoxikations-symptomatik. Konzentrationsbestimmung mittels RIA. Bis auf eine Mitteilung weisen alle übrigen Erhebungen einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der toxischen und nicht toxischen Serumspiegel auf. Die toxischen Konzentrationen sind um den Faktor 2,4 größer als die nicht toxischen. (Unsere Erhebungen mit 5 kommerziellen RIA an 186 optimal digitalisierten Patienten ergaben Digoxin-Serumkonzentrationen ($\bar{x} \pm s$) von $0,70 \pm 0,54$ bis $1,41 \pm 0,78$ ng/ml).

kommerziell angebotener Digoxin-RIA.

Die bisher wenigen Publikationen zu diesem Thema - wir fanden bisher 7 (26, 67, 129, 190, 198, 254, 376), 2 davon befinden sich noch im Druck (26, 376) - berichten teils über eine befriedigende Übereinstimmung (67, 190), teils über erhebliche Diskrepanzen in der Konzentrationsbestimmung derselben Serumproben in verschiedenen RIA (26, 198, 254, 376). RIA mit ^3H -markiertem Digoxin scheinen höhere Konzentrationen zu ergeben als RIA mit ^{125}J -Markierung (67).

Patientenserum: Die untersuchten Seren entstammten Patienten, die klinisch optimal auf eine Erhaltungsdosis von Digoxin oder Digoxinderivaten (β -Acetyldigoxin, β -Methyldigoxin) ein-

gestellt waren. Hämolytische oder ikterische Seren, Seren von niereninsuffizienten Patienten oder von Patienten mit zusätzlicher Steroidhormon- oder Spironolactone-Medikation wurden von dieser Vergleichsuntersuchung ausgeschlossen, ebenso Seren von Patienten mit einer vom Normbereich abweichenden Albuminkonzentration oder von Patienten mit einer vorausgegangenen Diagnostik mit Radionukliden. Die Seren wurden entweder unverzüglich nach Eingang verarbeitet oder tiefgefroren bis zur Untersuchung aufbewahrt. Sie wurden freundlichlicherweise von der Medizinischen Klinik, Medizinischen Poliklinik und Strahlenklinik der hiesigen Universität sowie dem Sanatorium Wicker für Herz- und Kreislauferkrankheiten in Bad Wildungen zur Verfügung gestellt.⁺⁾

RIA: Die Untersuchungen wurden mit 5 verschiedenen, kommerziell in der BRD erhältlichen Digoxin-RIA durchgeführt (Tab. 4). 2 RIA waren mit ^3H -markiertem Digoxin (Nr. 1 und 2 der Tab. 4) und 3 RIA mit ^{125}J -markiertem Digoxin (Nr. 3, 4 und 5 der Tab. 4) ausgelegt. Jeder ^3H -RIA hatte als Pendant einen ^{125}J -RIA derselben Provenienz (Nr. 1 und 3, 2 und 4 der Tab. 4). Die Arbeitsanweisungen der Hersteller wurden befolgt. Jede Serumprobe wurde im Doppelansatz mit jedem der 5 RIA bestimmt.

Die im Text verwendete alphabetische Kurzbezeichnung A_1 , A_2 , B_1 , B_2 und C für die einzelnen RIA ist nicht identisch mit der fortlaufenden Nummerierung in der Tabelle 4. ^3H -RIA sind als A_1 , B_1 , ^{125}J -RIA als A_2 , B_2 , C ausgewiesen.

Kontrollseren: In jedem Testansatz liefen ein kommerzielles Kontrollserum mit einem ausgewiesenen Digoxingehalt von 2 ng/ml (Wellcontrol der Fa. Wellcome) und ein Patientenpoolserum mit, für die die Kurzbezeichnungen W und P gewählt wurden.

⁺⁾ Für die freundliche Unterstützung, insbesondere durch die Herren Prof.Dr.H.Hardewig, Prof.Dr.D.Klaus, Prof.Dr.F.Heß, Dr.R.Schafft und die Kollegen dieser Kliniken, danken wir verbindlichst.

- 1 Lanoxitest β , Wellcome Reagents Limited Beckenham/England, vertreten durch die Deutsche Wellcome GmbH, 3006 Großburgwedel.
Spezifikation: ^3H -Digoxin, Antikörper vom Kaninchen, Dextran-Charcoal-Separation, Liquid-Szintillationsmessung.
- 2 Digoxin Radioimmunoassay Kit (DIGOK), CEA-IRE-SORIN, vertreten durch die Isotopen Dienst West GmbH, 6079 Spremlingen.
Spezifikation: ^3H -Digoxin, Antikörper vom Schaf, Dextran-Charcoal-Separation, Liquid-Szintillationsmessung.
- 3 Lanoxitest μ , Wellcome Reagents Limited Beckenham/England, vertreten durch die Deutsche Wellcome GmbH, 3006 Großburgwedel.
Spezifikation: ^{125}J -TME-Digoxin, Antikörper vom Kaninchen und Esel, Doppelantikörper-Separation, Bohrlochszintillationsmessung.
- 4 Digoxin Radioimmunoassay Kit (DIGOK-125), CEA-IRE-SORIN, vertreten durch die Isotopen Dienst West GmbH, 6079 Spremlingen.
Spezifikation: 3-O-Succinyl-digoxigenin-tyrosin- ^{125}J , Antikörper vom Schaf, Dextran-Charcoal-Separation, Bohrlochszintillationsmessung.
- 5 Digoxin Immutope Kit, E.R.Squibb and Sons, Princeton/USA, vertreten durch die Fa. von Heyden, 8 München.
Spezifikation: 3-O-Succinyl-digoxigenin-tyrosin- ^{125}J , Antikörper vom Kaninchen, Dextran-Charcoal-Separation, Bohrlochszintillationsmessung.

Tab. 4: Spezifikation der für die Vergleichsuntersuchung verwendeten Digoxin-RIA. Die Auflistung in arabischer Zahlenfolge ist nicht identisch mit der im Text verwendeten internen RIA-Identifikationen A₁, A₂, B₁, B₂, C.

RIA	Stand.	n	Streubreite	$\bar{x}$	$\pm s$	Vk(%)
A ₁	W	30	1,75-2,80	2,26	0,28	12,40
B ₁	P(32)	↓	1,15-1,65	1,42	0,17	11,71
B ₂	P(32)		1,55-1,85	1,67	0,09	5,25
C	P(177)		1,17-1,35	1,24	0,05	4,4

Tab. 5: Intraassay-Variation bei Simultanbestimmungen im selben Testansatz zur Beurteilung der Präzision. Einsatz des kommerziellen Digoxin-Standards W und der Patientensera P(32) und P(177). Konzentrationsangaben in ng/ml Serum. Kleine Streuungen in den RIA B₂ und C.

Ergebnisse:

Intra- und Interassay-Variation: Die Mehrfachbestimmung der 2 Standardseren W und P in jedem Testansatz mit jeweils neu erstellter Eichkurve zeigt erwartungsgemäß eine größere Streuung als bei der Simultanbestimmung in ein und demselben Testansatz (Tab. 5). Der Variationskoeffizient V_k als ein Maß der Streuung ist für das Poolserum P mit relativ geringem Digoxingehalt in 4 von 5 Kits größer als 20% (Tab. 6). Bei höherer Digoxinkonzentration wie im Kontrollserum W ist die Streuung in den ^{125}J -RIA mit einem V_k von 5,28-10,01% kleiner als in beiden ^3H -RIA mit einem V_k von 14-27% (Tab. 6). Die Interassay-Variation kann auch als Chargen-Variation angesehen werden, da die einzelnen Testansätze mit verschiedenen Chargen durchgeführt wurden.

Recovery: Die Wiederfindung der deklarierten Konzentration im Kontrollserum W war in den verschiedenen RIA bei Mehrfachbestimmung unterschiedlich. Um 20-30% mehr Digoxin, als der Vorgabe entsprach, wurde mit 2 RIA derselben Provenienz (A_1 , A_2) bestimmt, während mit einem ^3H -RIA (B_1) fast 20% weniger nachgewiesen wurde (Tab. 7).

Patientenseren: Entsprechend der unterschiedlichen Recovery in den einzelnen 5 RIA fielen auch die Konzentrationsbestimmungen der Patientenseren verschieden aus (Tab. II). Die Mittelwerte aller Bestimmungen in den einzelnen RIA von denselben Seren zeigten deutliche Differenzen (Tab. 8). Der Unterschied in der Bestimmung tritt am stärksten zwischen den RIA A_1 , A_2 und B_1 hervor; die Mittelwerte unterscheiden sich um den Faktor 2, d.h. für dasselbe Patientenserum wird der Digoxingehalt in dem einen RIA doppelt so hoch ermittelt wie im anderen RIA. Die Bestimmungen in den 5 RIA unterscheiden sich signifikant voneinander bei einem vorgegebenen Vertrauensbereich von 95% bis auf 2 Vergleichskombinationen: A_1 und A_2 , B_2 und C (Tab. 10). Somit entsprechen sich nur die Bestimmungen in den RIA A_1 und A_2 so wie B_2 und C. Entsprechend den Unterschieden in der Konzentrationsbestimmung differieren auch die Korrelationskoeffizienten (Tab. 10) und

RIA	Stand.	n	Streubreite	$\bar{x}$	$\pm s$	Vk(%)
A ₁	W	7	1,74-3,75	2,60	0,71	27,40
	P	7	0,94-1,82	1,41	0,38	27,00
A ₂	W	5	2,24-2,56	2,40	0,15	6,25
	P	5	1,04-1,99	1,58	0,41	26,00
B ₁	W	9	1,40-2,15	1,63	0,23	14,11
	P	9	0,60-1,10	0,85	0,20	23,50
B ₂	W	10	1,60-2,20	1,85	0,18	10,01
	P	10	0,75-1,50	1,06	0,26	24,34
C	W	8	1,74-2,05	1,88	0,10	5,28
	P	8	0,9 -1,35	1,16	0,16	13,42

Tab. 6: Interassay-Variation eines kommerziellen Digoxin-Standards W und eines Patienten-Poolserums P bei Wiederholungsmessungen in mehreren Testansätzen von verschiedenen Chargen. Digoxin-Konzentrationen in ng/ml Serum. Die Streuung ist z.B. für das Poolserum am geringsten im RIA C und am größten im RIA A₁.

RIA	Digoxin-Vorgabe	n	Streubreite d. Bestim.	$\bar{x}$ d. Bestim.	Recovery %
A ₁	2,0 ↓ ↓ ↓ ↓	7	1,74-3,75	2,60	130,0
A ₂		5	2,24-2,56	2,40	120,0
B ₁		9	1,40-2,15	1,63	81,5
B ₂		10	1,60-2,20	1,85	92,5
C		8	1,74-2,05	1,88	94,0

Tab. 7: Wiederfindungs-Untersuchungen desselben kommerziellen Digoxin-Standards in mehreren Testansätzen von verschiedenen Chargen. Digoxin-Konzentration in ng/ml Serum. Die Wiederfindung (Recovery) ist im Mittel größer als die Vorgabe in den RIA A₁, A₂ und kleiner in den RIA B₁, B₂, C.

	RIA A ₁	RIA A ₂	RIA B ₁	RIA B ₂	RIA C
n	186				
$\bar{x}$	1,413	1,410	0,700	0,908	0,876
$\pm s$	0,782	0,760	0,542	0,514	0,495

Tab. 8: Mittelwerte und einfache Standardabweichung der Einzelwerte in ng/ml von 186 Patientenserum, deren Digoxinkonzentration in Doppelbestimmung mit 5 verschiedenen RIA ermittelt wurde. Die größte Mittelwertdifferenz besteht zwischen den RIA A₁, A₂ und C; der Quotient beträgt 2.

f	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	C
A ₁	1,00	1,03	0,45	0,71	0,62
A ₂	0,97	1,00	0,44	0,69	0,60
B ₁	2,21	2,27	1,00	1,56	1,37
B ₂	1,42	1,45	0,64	1,00	0,88
C	1,61	1,66	0,73	1,14	1,00

Tab. 9: Mittelwert-Verhältnis für 5 verschiedene RIA (Digoxin). Die Zahlen resultieren aus der Division der Mittelwerte, die durch die Bestimmung der gleichen Seren mit den einzelnen Testen gewonnen wurden. Die Verhältniszahlen geben an, um welchen Faktor f sich der Mittelwert eines Testes von dem der anderen unterscheidet.

$$(f = \frac{\text{Mittelwert des Testes in horizontaler Richtung}}{\text{Mittelwert des Testes in vertikaler Richtung}})$$

Die diesen Faktoren zugrunde liegenden Mittelwerte der Digoxinbestimmungen in den verschiedenen RIA sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Interessiert z.B. der Vergleich des RIA B₁ mit dem RIA C, so besagt der aus dieser Tabelle entnommene Faktor 1,37, daß die im RIA C zu erwartende Digoxinbestimmung im Mittel um diesen Faktor größer ist als im RIA B₁.

die Regressionsgeraden (Abb. 34). Die Korrelation innerhalb der ³H- und ¹²⁵J-RIA der gleichen Provenienz (A₁ und A₂, B₁ und B₂) ist mit 0,731 und 0,730 erwartungsgemäß bei der Verwendung desselben Antiserums und Standard-Digoxins relativ

Teste	n	Regressions- gerade	r	Signifikanz (95% Konfidenz- ber.)
A ₁ -A ₂	186	y=0,734x+0,372	0,756	
A ₁ -B ₁		y=0,320x+0,248	0,462	+
A ₁ -B ₂		y=0,377x+0,375	0,573	+
A ₁ -C		y=0,369x+0,354	0,582	+
A ₂ -B ₁		y=0,478x+0,025	0,671	+
A ₂ -B ₂		y=0,498x+0,250	0,736	+
A ₂ -C		y=0,515x+0,150	0,789	+
B ₁ -B ₂		y=0,667x+0,441	0,702	+
B ₁ -C		y=0,636x+0,431	0,696	+
B ₂ -C	↓	y=0,753x+0,192	0,782	

Tab. 10: Varianzanalytischer Vergleich von 5 RIA (A₁, A₂, B₁, B₂, C) anhand von Doppelbestimmungen an denselben 186 Patientenserum. Zwischen den meisten 2-Testkombinationen besteht ein signifikanter Unterschied im vorgegebenen Konfidenzbereich von 95% bis auf den Vergleich zwischen den RIA A₁ und A₂ sowie B₂ und C.

eng (Abb. 35 und 36). Da aber zwischen den Meßdaten aller 5 RIA statistisch eine Korrelation gegeben ist, sind die Konzentrationsbestimmungen konvertierbar durch Faktorenmultiplikation (Tab. 9).

Die um den Faktor 2 abweichende Bestimmung derselben Serumproben veranlaßte uns zu einer Kontrolluntersuchung durch andere Labors. In 2 derartigen Ringversuchen erwies sich ebenfalls eine Abweichung der Resultate um den Faktor 2-3 (Tab. 11 und III).

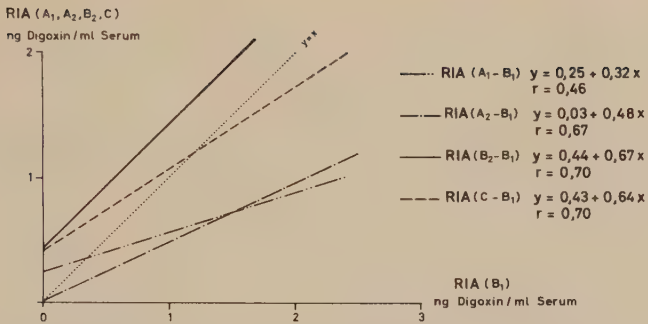


Abb. 34: Regressionsgeraden und Korrelationen zwischen den mit verschiedenen RIA ermittelten Digoxinbestimmungen. Die einzelnen RIA sind jeweils mit dem RIA B₁ korreliert, mit dem die niedrigsten Digoxinkonzentrationen bestimmt wurden (Mittelwert 0,70 ng/ml). Signifikanter Unterschied der Mittelwerte aller miteinander verglichenen RIA ($p < 0,001$).

	RIA B ₁ ng/ml	L ₁ ng/ml	L ₂ ng/ml	L ₃ ng/ml	L ₄ ng/ml	Streu- breite	F ₁	F ₂
Mod.I	0,0	0,36	0,1	0,12	0,16	0,0-0,36	3,6	3,6
Mod.V	1,2	1,8	1,9	3,0	2,46	1,2-3,0	2,5	1,7
Pat.W.	0,5	0,9	0,7	1,33	0,9	0,5-1,33	2,6	1,9
Pat.M.	1,2	1,4	1,7	1,9	2,08	1,2-2,08	1,7	1,2
Pat.V.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,66	0,0-0,66	6,6	6,6
							3,4	3,0

Tab. 11: Digoxinbestimmung mittels RIA von 3 Patientenserum und 2 Modellserum (durch Digoxinzugabe in vitro präpariert) durch uns (³H-RIA B₁) und 4 andere Universitätslabors der BRD (L₁-L₄) im sogen. Ringversuch. Große Streubreiten aller 5 Labors: im Mittel um den Faktor (F₁) 3,4, der 4 auswärtigen Labors um den Faktor (F₂) 3,0.

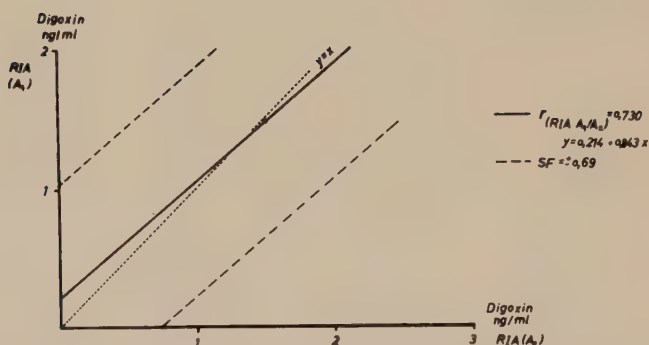


Abb. 35: Regressionsgerade mit Bereich des Standardfehlers $\pm SF$ (95% aller Einzelwerte) zwischen den Meßergebnissen zweier RIA gleicher Provenienz (RIA A_1 und A_2).

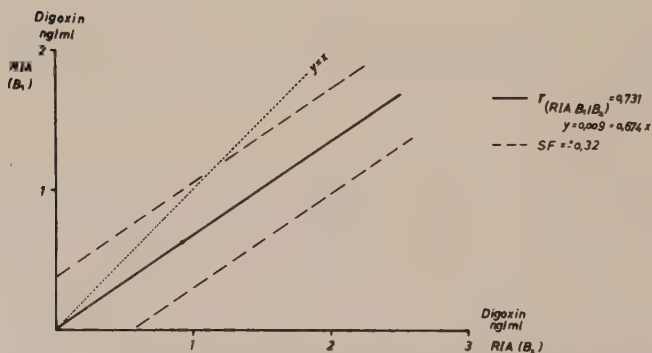


Abb. 36: Regressionsgerade mit Bereich des Standardfehlers $\pm SF$ (95% aller Einzelwerte) zwischen den Meßergebnissen zweier RIA gleicher Provenienz (RIA B_1 und B_2).

Diskussion

In unserer Vergleichsuntersuchung treten deutliche Differenzen in der Bestimmung der Serumdigoxinkonzentrationen hervor, die bis um das Zweifache voneinander abweichen können (Tab.8). Die Varianzanalyse bestätigt systematische Unterschiede für die meisten miteinander verglichenen RIA (von 10 Vergleichskombinationen sind 8 signifikant verschieden mit einem $p < 0,05$) (Tab. 10). Bei Befolgung der Arbeitsvorschriften und der Testdurchführung durch nicht mehr als 2 aufeinander seit Jahren gut abgestimmte Personen können u.E. die Ursachen für die statistisch gesicherten systematischen Unterschiede nur in den einzelnen RIA selbst begründet sein.

Bei den bisher wenigen mitgeteilten Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Digoxin-RIA wurden z.T. ähnliche Diskrepanzen beobachtet. Bei einem Vergleich von 2 RIA mit ^3H - und ^{125}J -Markierung desselben Herstellers mit identischem Antiserum und Standarddigoxin wurden an 55 Patientenseren durchweg höhere Konzentrationen mit dem ^3H -RIA bestimmt (67); zwischen den Meßwerten bestand eine Korrelation mit einem r von 0,778. Zwischen 6 ^{125}J -RIA mit verschiedenen Trenntechniken (Dextran-Charcoal, Doppelantikörper, Solid-phase) wurde eine breite Variation an 10 Patienten gefunden (254); die Bestimmungen derselben Seren reichten z.B. von 1,8-4,1 oder 0,1-1,5 ng/ml, der V_k in der Interassay-Variation schwankte zwischen 1 und 20,4%, die Recovery für 0,5 ng/ml Digoxin lag zwischen 12 und 128%. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse mit 4 RIA (1 ^3H - und 3 ^{125}J -RIA) von 56 parallel getesteten Patientenseren stimmten die Resultate nur zwischen einem der 3 ^{125}J -RIA und dem ^3H -RIA überein, während mit den beiden anderen ^{125}J -RIA in 90% der Fälle zu niedrige Konzentrationen ermittelt wurden (198). Von 3 RIA (1 ^3H - und 2 ^{125}J -Markierungen) stimmten der ^3H - und ein ^{125}J -RIA in ihren Meßergebnissen an 41 Digoxinseren weitgehend überein mit einem r von 0,962, während der zweite ^{125}J -RIA deutlich abwich (376). Mit 6 ^3H -RIA wurden an Seren von 15 niereninsuffizienten Patienten mit einem maximalen Serumkreatinin von 14 mg% und stärkster Hypalbuminämie von

1,4 g% große Schwankungen in der Digoxinbestimmung festgestellt (26); die größte Differenz desselben Serums lag zwischen 0,31 und 3,22 ng/ml Digoxin. Über eine günstige Korrelation mit einem r von 0,831 zwischen einem ^3H - und ^{125}J -RIA desselben Herstellers berichtet eine andere Veröffentlichung anhand von 95 Patientenseren (190); diese Feststellung mit 2 RIA derselben Provenienz deckt sich auch mit unseren Erhebungen (Abb. 35 und 36).

Fehlerquellen können in der Arbeitsweise, in der Störanfälligkeit verschiedener Testschritte, in der Qualität und Qualitätsänderung der Reagenzien sowie im Patientenserum selbst liegen. Bezüglich der Qualitätsänderung des Antikörpers sei bemerkt, daß dieser zu einem Teil an der Glaswand haften, enzymatisch oder durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren zerstört werden kann. H-Verschiebungen inaktivieren die immunologische Reaktion.

1. Pipettier- und Zählfehler: Bei der Fehlerdiskussion kommen Pipettier- und Zählfehlern keine besondere Bedeutung zu; sie betreffen etwa gleichermaßen alle 5 RIA. Auch für kleine Volumina sind die Dosierungsfehler bei den von uns verwendeten automatischen Pipetten (System Eppendorf und Clay Adams) klein (unter 3%). Bei einer minimalen Impulszahl/Min. von 2000 pro Probe (die Meßzeit wurde entsprechend vorgewählt) betrug der Zählfehler nicht mehr als 2,5%. Eine im Einzelfall nicht ausgeschlossene falsche Volumenzugabe an Reaktionspartnern verursacht zwar deutliche Meßfehler entsprechend Abb. 37, kann aber nur die Streuung der Einzelwerte vergrößern, nicht jedoch einen systematischen Unterschied bei wiederholter Anfertigung von Eichkurven mit jedem Testansatz bedingen. Unsere jeweils erstellten Eichkurven wiesen sowohl von derselben als auch von anderen Chargen keine wesentlichen Abweichungen auf (Abb. 38).

2. Reaktionszeit: Eine unkorrekte Einhaltung der Reaktionszeit von Antiserum, Tracer und Patientenserum kann beson-

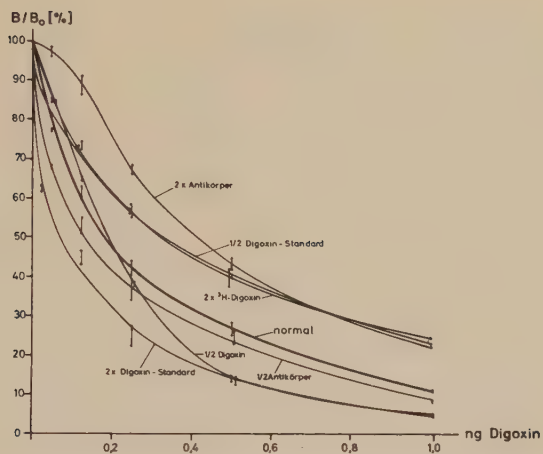


Abb. 37: Verschiedene Kompetitionskurven im selben Testansatz durch Änderung der Quantitäten der Reaktionspartner. Bestimmung mit dem RIA B_1 .

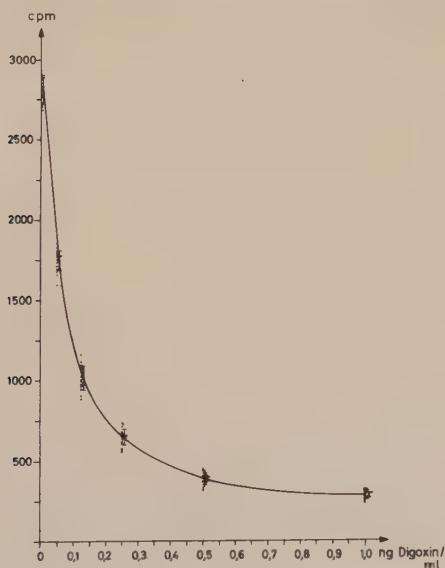


Abb. 38: Wiedergabe von 20 simultanen Eichkurvenansätzen mit dem ^{125}J -RIA B_2 der gleichen Charge. Die Streubalken geben den Mittelwert mit der einfachen Standardabweichung wieder. Alle Eichansätze - einschließlich die im asymptotischen Kurvenverlauf - unterscheiden sich signifikant voneinander.

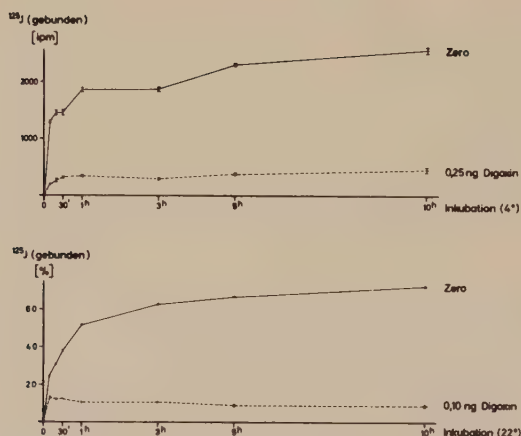


Abb. 39: Bildung des Digoxin-Antikörper-Komplexes in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, ermittelt mit dem ^{125}J -RIA B_2 . Für den Ansatz ohne Zugabe von unmarkiertem Standard-Digoxin (Zero) ist die Sättigung der Bindungsstellen des Antikörpers bei der empfohlenen Inkubationszeit von 30 Min. noch nicht abgeschlossen, weshalb Zeitschwankungen zu einer Fehlerquelle werden können.

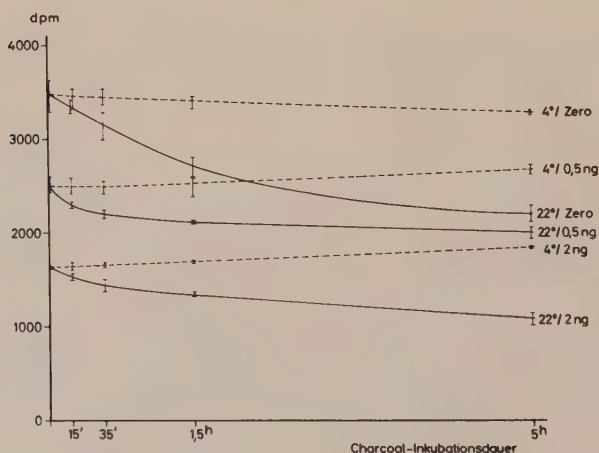


Abb. 40: Einfluß der Inkubationsdauer mit Dextran-Charcoal auf die Radioaktivitätsmessung des Überstandes als Ausdruck einer Änderung der Gleichgewichtseinstellung zwischen dem an den Antikörper und an die Aktivkohle gebundenen Digoxin. Die Gleichgewichtseinstellung ist temperatur-abhängig; bei 4°C ist die Inkubationszeit von untergeordneter Bedeutung. Bestimmung mit dem RIA B_1 .

ders dann zu fehlerhaften Ergebnissen führen, wenn nicht im Äquilibrium, d.h. im eingetretenen Reaktionsgleichgewicht, aus Zeitersparnis gearbeitet wird (Abb. 39). Grundsätzlich müssen Eichkurvenansätze und Patientenproben gleich behandelt werden. Wird der Test nur von einer einzigen MTA durchgeführt, so empfiehlt sich nach unseren Erfahrungen die Beschränkung des Probenumfanges auf 50-60 Röhrchen. Die parallel gestellten Doppelproben werden nicht hintereinander, sondern in U-Form pipettiert - so gleichen sich in der Doppelbestimmung die durch den Pipettiervorgang bedingten Zeitunterschiede bei der Mittelwertbildung wieder aus. Eine andere Möglichkeit, die Inkubationszeit in engen Grenzen zu halten, besteht darin, fraktioniert zu inkubieren mit mehreren Gestellen zu je 8-10 Proben und jeweils eigener Zeituhr.

3. Dextran-Charcoal-Trennung: Mit Fehlern bei der Abtrennung des nicht gebundenen Digoxins vom Hapten-Antikörperkomplex muß je nach Größe der Dissoziationskonstanten des Antiserums gerechnet werden (Abb. VI). Ist diese groß, so werden die durch den Pipettiervorgang fast unvermeidlich verschieden langen Inkubationszeiten trotz schneller Zugabe der Kohlesuspension mittels Repetierspritze (Typ Cornwall) das Meßergebnis beeinflussen. Auch hier halten wir uns an die Regel der Pipettierung in U-Form und an eine beschränkte Probenzahl. Quantitativ je nach Antiserum verschieden kommt es mit zunehmender Kohleinkubationsdauer besonders bei Zimmertemperatur zu einer exponentiell ablaufenden Dissoziation des Hapten-Antikörperkomplexes als Ausdruck einer Reäquilibration nach dem Massenwirkungsgesetz (128,220,417,477), die bis zu 60% innerhalb einer Stunde betragen kann (353). Wir fanden dieses Problem bei Zimmertemperatur bestätigt, nicht aber bei 4°C (Abb. 40). Diese Beobachtung spricht für eine Temperaturabhängigkeit der Assoziationskonstanten des Antiserum. Das aus der Dissoziation wieder freigesetzte markierte und nicht markierte Digoxin wird an die Kohle absorbiert; dadurch wird im Überstand weniger Radioaktivität gemessen und an der Eich-

kurve eine falsch zu hohe Digoxinkonzentration abgelesen. Als Alternative zur Dextran-Charcoal-Separation bieten sich Präzipitationsverfahren mit ZnSO_4 nach Somogyi (319) oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (128) an, wodurch allerdings die unspezifische Tracerbindung auf 20-30% ansteigt und eine Korrektur durch Parallelansätze von sog. blanks erfordert.

4. Hypalbuminämie: Bei Hypalbuminämie kommt es zu einer signifikant stärkeren Tracer-Antikörperbindung mit umgekehrter Proportionalität (220); d.h. je geringer die Albuminkonzentration ist, umso größer ist die Tracerbindung. Nicht parallel damit geht eine Abnahme der prozentualen Digoxin-Serumproteinbindung, wie Untersuchungen an entsprechenden hypalbuminämischen Patientenserum mittels Ultrafiltration gezeigt haben. Durch die stärkere Antikörper-Tracerbindung wird im Überstand eine höhere Aktivität gemessen und entsprechend eine falsch niedrigere Digoxinkonzentration an der Eichkurve abgelesen. Einer Literaturnotiz zufolge kann durch Verwendung von Gelatine anstatt Dextran diesem Phänomen entgegengewirkt werden (60). In unser Untersuchungsgut hatten wir a priori keine Seren mit verringerter Albuminkonzentration aufgenommen.
5. TBG: Unter den Schilddrüsenhormonen hat besonders das Thyroxin eine hohe Affinität zu seinem Transportprotein TBG. Da ^{125}J -Digoxin aus Markierungsgründen ebenfalls ein Tyrosin enthält, wird eine Bindung an TBG vermutet; es könnten so Fehlbestimmungen in Abhängigkeit vom TBG-Gehalt des Patientenserus resultieren (376).
6. Fremdradioaktivität: Durch eine unmittelbar vorausgegangene nuklear-medizinische in vivo-Diagnostik können im Serum Radionuklide persistieren, die sich bei der Messung des niederenergetischen ^{125}J und ^3H störend auswirken können, und zwar in Form einer höheren Countzahl, für die eine falsch zu kleine Digoxinkonzentration abgelesen wird (8, 67, 68, 75, 417). Wir konnten uns von diesem Störfaktor nach einer Pankreasszintigraphie mit ^{75}Se -Methionin über-

zeugen. Die Parallelmessung eines entsprechenden Serum-aliquots läßt diesen Kontaminationsfehler ebenso korrigieren wie eine vorgeschaltete Digoxinextraktion aus dem Serum. Dieses Problem hatte aber infolge der vorherigen Selektion bei unseren Patientenseren nicht bestanden.

7. Quench-Effekt: Die Messung der β -Radioaktivität des ^3H wird durch sog. Löscheffekte bei Anwesenheit von Chemikalien und Farbstoffen störend beeinflusst. Abnahme der Countzahl und falsch höhere Digoxinkonzentrationsbestimmungen sind die Folgen. Wenn auch die Meßgeräte weitgehend automatisch diesen Quench korrigieren, so ist dennoch für die Einzelprobe mit Abweichungen zu rechnen. Colorquenches treten bei hämolytischen oder ikterischen Seren auf; Chemolumineszenz wird bei urämischen Seren vermutet (8, 41,67,68,75). Auch solche Seren hatten wir nicht a priori in unsere Vergleichsstudie einbezogen.
8. Eichkurve: Mit demselben Digoxin-Standard und Antiserum können allein unter Verwendung verschiedener Nullseren, d.h. digoxinfreier Patientenseren, unterschiedliche Eichkurven erstellt werden (67). Die sich dadurch ergebenden Ablese-differenzen können bis zu 1 ng/ml Digoxin betragen. Da bei den Nullseren von gesunden Probanden keine Abweichungen in der Serumzusammensetzung nachgewiesen werden konnten, werden ursächlich noch unbekannte Plasmafaktoren oder eine Änderung in der Bindungseigenschaft der Plasmaproteine vermutet.
9. ^{125}J -Markierung: Die Anfügung von Tyrosyl- mit Succinyl- oder Lysyl-gruppen für die ^{125}J -Markierung verändern die Struktur des Digoxinmoleküls im Gegensatz zur selektiven oder auch ungezielten ^3H -Austauschmarkierung (Abb. V). Da die Antikörperbildung auf das unveränderte Digoxin (gekoppelt an Albumin oder Polylysin) erfolgt, ist mit einer Affinitätsänderung des Antiserums zum ^{125}J -markierten Digoxinderivat zu rechnen (198). Eine Abnahme der ^{125}J -Tracer-Antikörperbindung auf 87-45% gegenüber der ^3H -Digoxinbindung konnte bestätigt werden (417). Daraus können -

verbunden mit einer Sensitivitätsabnahme des RIA - abweichende Konzentrationsbestimmungen resultieren, wie Vergleichsuntersuchungen zwischen ^3H - und ^{125}J -RIA mit kleineren Konzentrationswerten für den ^{125}J -RIA ergeben haben (67).

10. Kreuzreaktion: Aufgrund der geringen Strukturunterschiede zwischen den einzelnen Herzglykosiden ist mit Kreuzreaktionen des Antikörpers zu rechnen; das gilt ganz besonders für Digitoxin, das sich vom Digoxin nur durch eine OH-Gruppe unterscheidet. Für 20 ng vorgegebenes Digitoxin wurden beispielsweise in 6 verschiedenen ^{125}J -RIA, 0,01-2,34 ng Digoxin bestimmt (254). Wir wiesen in einem Freiwilligen-Versuch mit 1,5 mg Digitoxin i.v. über mehrere Stunden 2 ng/ml Digoxin fälschlicherweise nach (Abb.41); die Parallelbestimmung des Serumdigitoxinprofils zeigte, daß ca. 10% der Serumdigitoxinkonzentration als Digoxin nachweisbar sind. Bei gleichzeitiger Verabreichung von Digitoxin und Digoxin oder bei therapeutischem Wechsel von Digitoxin auf Digoxin läßt sich die aktuelle Digoxinkonzentration nach der Formel $D_a = D_o - 0,0886 T$ berechnen, wobei D_o der gemessene Digoxinspiegel und T die mittels eines Digitoxin-RIA gemessene Digitoxinkonzentration bedeuten. Dieser Formel liegt die beobachtete Linearität in der quantitativen Digoxinbestimmung durch Digitoxin zugrunde (258).

Gegen Digoxin-Metabolite wie Bis- und Monodigitoxo-digoxigenin zeigen die meisten gegen Digoxin erzeugten Antisera eine etwa gleich große Affinität wie für das Digoxin selbst (272,330,353). Wir machten ebenfalls diese Beobachtung (Abb. 42). Ein anderes Untersucherteam fand in 6 verschiedenen ^3H -RIA die Affinitäten zu diesen beiden Metaboliten jedoch erheblich unterschiedlich (26). Gegen Digoxigenin besteht in der Regel eine geringere Affinität (272,353,432), die in unseren Untersuchungen nicht so deutlich zum Ausdruck kommt (Abb. 42). Interessanterweise nimmt die Affinität zum Antikörper erst wesentlich nach

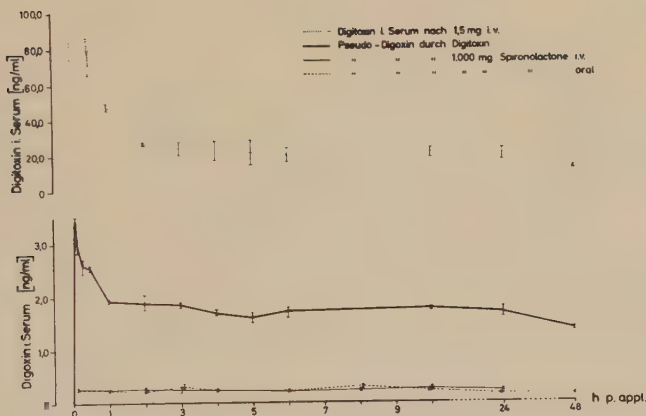


Abb. 41: Radioimmunchemische Pseudo-Digoxinbestimmung im Serum durch Kreuzreaktion mit Digitoxin und Spiro-nolactone. Profilkurven über 24 bzw. 48 Std. nach einmaliger Applikation von 1,5 mg Digitoxin i.v., 1.000 mg Aldactone^R i.v. bzw. oral. Etwa 10% Kreuzreaktion mit Digitoxin, unbedeutende Kreuzreaktion mit Spironolactone.

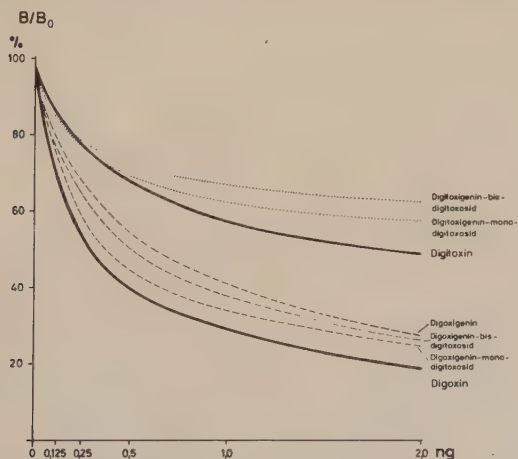


Abb. 42: Digoxin-Eichkurve mit Standard-Digoxin (stark ausgezogene untere Kurve) sowie mehrere Kompetitionskurven mit Digitoxin und verschiedenen Digitalismetaboliten als Ausdruck von Kreuzreaktionen mit dem Antiserum, erstellt mit dem RIA B₁. (Digoxin wurde als Reinsubstanz von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen, die Metaboliten von Digoxin und Digitoxin dankenswerterweise von Herrn Dr.F.Kaiser, Fa. Boehringer, Mannheim).

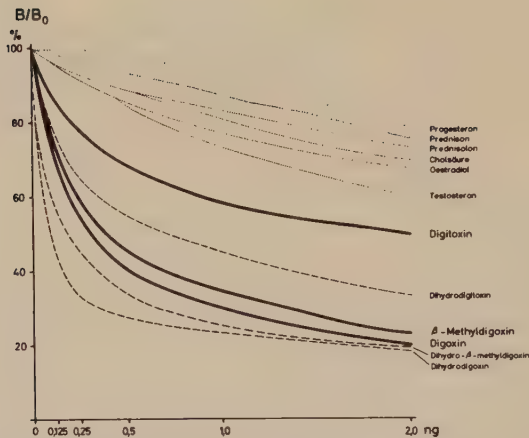


Abb. 43: Kompetitionskurven mit verschiedenen hydrierten Digitalisglykosiden, Steroidhormonen und Cholsäure im Vergleich zur Digoxin-Eichkurve, erstellt mit dem RIA B₁.
(Steroidhormone und Cholsäure wurden als Reinsubstanzen von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen; β -Methyldigoxin und die 3 Dihydrodigitalisglykoside verdanken wir Herrn Dr. F. Kaiser, Fa. Boehringer, Mannheim).

Abtrennung der gesamten Zuckerkette ab; nach Repke (372) kommt der Zuckerkette bei der Fixierung am Rezeptor die Bedeutung einer Hilfsgruppe zu - Parallelen dürfen wohl bei der Hapten-Antikörperbindung vermutet werden.

Bei der ohnehin geringen Metabolisierungsrate des Digoxins von ca. 10 bzw. 5% (306,470) dürfte die geringere Affinität des Antiserums zum Digoxigenin nicht von merklichem Einfluß gewesen sein.

Interessanterweise zeigte in unseren Glykosidtesten das Antiserum keine verringerte Affinität zu Digitalisderivaten mit hydriertem Lactonring wie z.B. für Dihydrodigoxin, Dihydro- β -methyldigoxin und Dihydrodigitoxin (Abb. 43). Offensichtlich hat der Lactonring für die Hapten-Antikörperbindung nicht die Bedeutung wie für die Rezeptorbindung; Repke (371) bezeichnet den Lactonring als funktionelle Gruppe und mißt ihr die entscheidende Bedeutung bei der Fixierung am Rezeptor über eine H-Brückenbindung zu; eine

Positionsänderung oder Hydrierung des Lactonringes hebt sowohl die Bindung am Rezeptor als auch die kardioaktive Wirkung auf - anders scheinen also die Verhältnisse bei der Hapten-Antikörperbindung zu liegen.

Acetyl- und Methylderivate des Digoxins werden nach unseren Untersuchungen - wie auch in der Literatur beschrieben (271,353) - mit unveränderter Affinität vom Antidigoxin-Antikörper gebunden (Abb. 31).

Kreuzreaktionen mit Medikamenten und Hormonen von Steroidstruktur sind mitgeteilt worden; jedoch sind diese im allgemeinen sehr gering, besonders in physiologischen Hormonkonzentrationen (Abb. 43). Für Progesteron, Testosteron, Cortisol, Oestradiol, Dehydroepiandrosteron und Cholesterin beträgt die Kreuzreaktion nur ca. 0,03% (128). Bedeutender soll in Abhängigkeit von der Dosis der Einfluß von Spironolactone sein (51,220,252,355) (Abb. 44). Wir fanden in 2 Freiwilligen-Versuchen mit je 1.000 mg Aldactone^R i.v. und oral als Einmaldosis zu keinem Zeitpunkt innerhalb von 24-48 Stunden eine wesentliche Fehlbestimmung von Digoxin (Abb. 41).

Digitalisfreie Seren von Patienten mit therapeutischen Dosen von Catapresan^R, Presinol^R, Lasix^R, Aldomet^R, Durabolin^R, Zyloric^R und Endoxan^R ergaben fälschlicherweise in 6 ³H-RIA nur geringe Digoxinkonzentrationen bis maximal 0,17 ng/ml (26). Unsere untersuchten Patienten-seren enthielten weder Spironolactone noch therapeutisch verordnete Steroidhormone.

11. Standard-Digoxin: Vom Standard-Digoxin zur Erstellung der Eichkurve werden hohe Reinheit und exakte Dosierung gefordert (407). Den kommerziellen RIA ist bereits Standard-Digoxin beigegeben. Bei der Suche nach der Ursache, warum unter den von uns verwendeten RIA gerade 2 RIA derselben Provenienz (A₁, A₂) generell deutlich höhere Digoxinkonzentrationen anzeigten, überprüften wir alle Digoxin-Standards der 5 RIA und zwar mit dem RIA A₁ (Abb. 45). Dabei ergab sich, daß die Eichkurven mit 3 Fremd-Digoxin-Standards (darunter ein selbst präparierter) dicht ge-

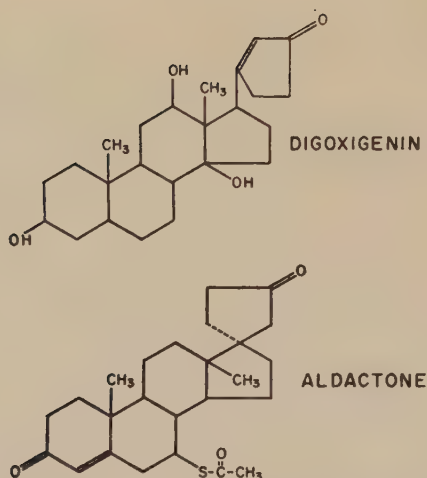


Abb. 44: Strukturähnlichkeit von Spironolactone und Digoxigenin, wodurch sich Kreuzreaktionen des Antidigoxin-Antiserums erklären lassen.
(Entnommen: Steiness, E. (429))

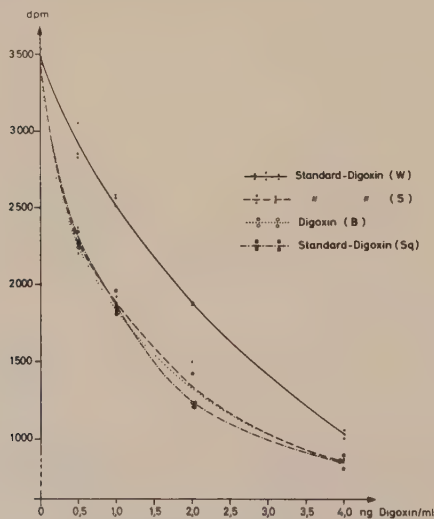


Abb. 45: Differente Eichkurven, die simultan mit dem gleichen RIA A₁ unter Verwendung verschiedener Standard-Digoxine erhalten wurden. Für die durchgezogene Eichkurve, die deutlich von den übrigen 3 eng gebündelten Kurven abweicht, muß eine geringere Standard-Digoxinkonzentration angenommen werden; an dieser Eichkurve abgelesene Serumproben ergeben folglich zu hohe Digoxinkonzentrationen, wie wir stets mit den RIA A₁ und A₂ bestätigt fanden.

bündelt verliefen, während die Eichkurve mit dem dem RIA A_1 vom Hersteller beigegebenen Digoxin isoliert oberhalb von dieser Kurvenschar gelegen war. Offensichtlich verdrängte dieses Digoxin weniger den Tracer von den Bindungsplätzen des Antikörpers, sodaß eine geringere Digoxinkonzentration als für die anderen Standard-Digoxine angenommen werden muß. Aus dieser Diskrepanz erklären sich die stets mit den RIA A_1 und A_2 höheren Digoxinbestimmungen; z.B. wird für dieselbe Probe mit 2000 dpm an der unteren Kurvenschar eine Konzentration von 0,86, an der oberen Eichkurve aber von 1,86 ng/ml abgelesen - der Unterschied beträgt mehr als das Doppelte. Diese Feststellung begründet sogleich die Forderung nach einem definierten, für alle RIA-Hersteller verbindlichen Digoxin-Standard.

7.2 RIA mit fixiertem Antikörper

Seit Anfang 1975 beschäftigten wir uns mit einem vom Prinzip her interessanten ^{125}J -Digoxin-RIA, bei dem in vorpräparierten Teströhrchen der Antikörper auf die Wandinnenfläche fixiert (coated tubes) und damit immobilisiert ist. Bei dieser Solid-phase-Methode entfällt die störanfällige Charcoal-Separation; die Entfernung des nicht gebundenen Tracers geschieht durch einfaches mehrmaliges Absaugen und Spülen. Ein anderer Vorteil liegt in der Störunanfälligkeit durch Radionuklidkontamination wie z.B. durch vorausgegangene nuklearmedizinische in vivo-Diagnostik. Ein dritter Vorteil besteht in der schnellen und einfachen Durchführbarkeit des Testes: bereits nach 1 Stunde kann das Ergebnis für die Klinik verfügbar sein - so könnte sich dieser Digoxin-RIA für Intensivstationen anbieten.

Die Auswertung unserer ersten Vergleichsuntersuchung mit einem Charcoal-RIA ergab eine etwas höhere Konzentrationsbestimmung in niederen Konzentrationen bis 1,55 ng/ml. Die Untersuchungsergebnisse von über 200 Patientenserum korrelierten mit dem Referenztest günstig mit einem r von 0,83 (Abb. 46) (331).

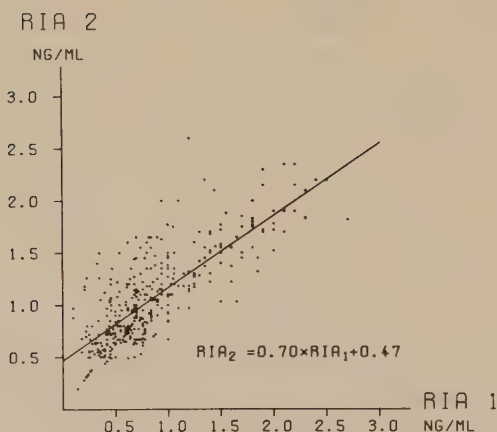


Abb. 46: Vergleich von Parallelbestimmungen als Duplikate von 225 Patientenseren mit 2 ^{125}J -Digoxin-RIA. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,83. (RIA 1 = Digoxin Radioimmunoassay Kit (using ^{125}J als marker), Schwarz-Mann; RIA 2 = Gammacoat ^{125}J -Digoxin Radioimmunoassay Kit, Clinical Assays Inc.)

8. Biologische Verfügbarkeit von Digoxin

Die Prüfung der biologischen Verfügbarkeit von Digoxin-Spezialitäten ist ein besonderes Anwendungsgebiet der entwickelten Digitalis-in-vitro-Bestimmungsmethoden, insbesondere des RIA (382).

Unter biologischer Verfügbarkeit als der deutschen Übersetzung für Bioavailability (engl.) oder Biodisponibilité (franz.) wird die dem Erfolgsorgan bzw. dem Rezeptor nach der Resorption und Leberpassage zur Verfügung stehende Wirkstoffmenge als Voraussetzung für den pharmakodynamischen Effekt verstanden; im Falle des Digoxins bedeutet die Bioverfügbarkeit die dem Herzmuskel angebotene Digoxinmenge.

Riegelman (378) definiert diesen Begriff als das Verhältnis der Menge eines Wirkstoffes, die in das Blut gelangt, zur Menge, die enteral verabreicht wird. Die Bioavailability ist mathematisch formulierbar als Bruchteil bzw. Prozentsatz der applizierten Dosis, der in die allgemeine Zirkulation

gelangt. Je höher dieser Prozentsatz ist, umso größer ist die biologische Verfügbarkeit und umgekehrt. Die Bioverfügbarkeit, die alle Partialvorgänge von der enteralen Verabreichung bis zum Erscheinen im Blut subsumiert, orientiert sich hauptsächlich an der meßbaren Blutkonzentration des Arzneistoffes und hat insofern enge Beziehungen zur Pharmakokinetik (98). In den Blutspiegel gehen nach Repke (372) alle limitierenden Faktoren ein. Dennoch ist nach Kuschinsky (262) der Blutspiegelwert nicht a priori eine Garantie für eine ausreichende Wirkstoffkonzentration am Zielorgan. Die Bioavailability beinhaltet mehr als die Resorptionsquote (99, 382, 420, 424) und ist nicht identisch mit der relativen enteralen Wirksamkeit als dem Wirkungsverhältnis bei Verabreichung gleichgroßer parenteraler und enteraler Wirkstoffdosen (420).

Das Problem der Bioavailability ist alt (430). Schon lange ist der Klinik bekannt, daß der therapeutische Effekt z.B. von Digoxinpräparaten je nach Hersteller und auch Charge schwanken kann und außerdem von den Resorptionsbedingungen abhängt. Neu ist, daß dieses Problem mit hochempfindlichen Mikromethoden meßbar und so die Produkte der Pharmaindustrie kontrollierbar geworden sind.

Die biologische Verfügbarkeit ist eine variable Größe und hängt von einer Vielzahl exogener und endogener Faktoren ab (382, 424). Exogene Faktoren sind die Applikationsart (oral, bukkal, rektal) und insbesondere die galenische Zubereitung als Lösung, Kapsel, Tablette, Fabrikationsprozeß (z.B. Preßdruck bei der Tablettierung), Korngröße der Reinsubstanz, Excipientien (die zwar pharmakodynamisch, nicht jedoch pharmakokinetisch inert sind), gleichzeitig verordnete Medikamente (Medikamentinteraktionen führen zu einer veränderten Pharmakokinetik der interessierenden Substanz mit dem Ergebnis einer Unter- oder Überdosierung (154), Speisen, die eine postprandiale Resorptionsverlangsamung verursachen (381, 466), (Tab. 12). Zu den endogenen Faktoren zählen die Beschaffenheit der Magen-Darmschleimhaut (entzündliche oder degenerative Veränderungen, Malabsorption (168, 207), Resektionen),

Galenik:

Kristallgröße, feste Lösungen, Solvate, Füllstoffe, Sprengstoffe, Matrices, Detergentien, Stabilisatoren, Fabrikationsfaktoren (z.B. Preßdruck) u.a. Der zur Lösung der aktiven Inhaltsstoffe fester Formen führende Prozeß verläuft über die Stufen: Disintegration – Disaggregation – Dissolution – echte Lösung, wird durch die obengenannten Faktoren bestimmt und kann in verschiedenen in vitro-Tests z.T. erfaßt werden.

Physiologische Parameter des Gastrointestinaltraktes:

Magen: Füllungszustand, Art der Speisen, Entleerungszeit, pH, Art und Menge des Magenschleims, Ausfällung des Pharmakons im Mageninhalt.

Darm: pH, Enzyme, nicht a priori zu übersehende Reaktion mit Gallensalzen, Darmmotilität, Malabsorptions-Syndrome.

Arzneimitteldisposition:

Darminhalt: Enzyme, Bakterienflora.

Darmwand: Glucuronidierung, Sulfatierung, MAO, Bindungsproteine

Leber: Metabolismus, Bindungsproteine.

Tab. 12: Faktoren, die die Bioverfügbarkeit eines Arzneimittels bei oraler Verabreichung beeinflussen können. Zu ergänzen wären noch die vielfachen Interferenzen mit anderen, simultan verabreichten Medikamenten.
(Entnommen: H.J.Dengler (99))

Geschwindigkeit der Peristaltik, Lebererkrankungen, endokrine Erkrankungen wie Hypothyreose, bei der die Resorption herabgesetzt ist (223).

Von der Partikelgröße des Wirkstoffes hängt die Lösungsgeschwindigkeit ab, von dieser die Resorptionsgeschwindigkeit. Löslichkeits- und Resorptionsgeschwindigkeit bestimmen entscheidend die Bioverfügbarkeit. Dem Parameter Resorptionsgeschwindigkeit kommt eine größere Bedeutung zu, als man bislang wußte (99). Die Resorptionsgeschwindigkeit bestimmt Ausmaß und Geschwindigkeit, mit denen ein Pharmakon in die Leber einströmt, in der es akkumuliert, an Proteine gebunden und metabolisiert wird; die Resorptionsgeschwindigkeit beeinflusst so das Verhältnis von unveränderter Substanz zu Metaboliten (99). Die Bioavailability umfaßt daher mehr als den Begriff der Resorptionsquote; sie kann als Summe von Freisetzung des Wirkstoffes, resorbierter Menge und Resorptionsgeschwindigkeit verstanden werden (420).

Unter dem Begriff "first pass effect" werden all jene Einflüsse zusammengefaßt, denen ein Pharmakon zwischen Darmkanal und Eintritt in die Blutbahn ausgesetzt ist, also insbesondere Resorption und primäre Verstoffwechslung während der Leberpassage (99). Durch diesen Effekt wird die Bioverfügbarkeit eingeschränkt (für Digoxin wird selbst unter optimalen Bedingungen ein Substanzverlust von 10-15% angenommen (382)). Auf diesem negativen "first pass effect" beruht z.B. die Unwirksamkeit von oral verabreichtem Adrenalin und Noradrenalin (262).

Die Bioavailability hat eine Bedeutung bei Substanzen, die 1. nicht 100%-ig wie Digitoxin resorbiert werden und 2. schwer wasserlöslich sind (424). Für die nachstehend genannten Pharmaka konnten Variationen in der Bioverfügbarkeit und damit eine therapeutische Inäquivalenz nachgewiesen werden: Acetylsalicylsäure, Ampicillin, Bishydroxycoumarin, Chinidin, Chloramphenicol, Digoxin, Diphenylhydantoin (Phenytoin), Erythromycin, Griseofulvin, Nitrofurantoin, Novobiocin, Oxytetracyclin, Spironolactone, verschiedene Sulfonamide, Tetracyclin, Theophyllin, Thyreoidea-Präparate, Tolbutamid (382,424).

Das Problem der Bioavailability beginnt außerhalb des Organismus, nämlich bei der pharmazeutischen Technologie. Die biologische Verfügbarkeit und insbesondere die Resorptionsgeschwindigkeit steigen mit der Vergrößerung der Oberfläche der in Tabletten oder Dragées in Kristallform vorliegenden Substanz, also mit der physikalischen Verkleinerung (Mikronisierung) des Wirkstoffes (154,382). Durch die Verkleinerung z.B. der Digoxinpartikel auf 3,7 Mikron konnte die Steady-state-Serumkonzentration bei gleicher Dosierung um 30% erhöht werden (396). Eine noch höhere Resorption war mit einem Copräzipitat, bestehend aus Digoxin und Polyvinylpyrrolidon (PVP), zu erreichen, in dem das Glykosid mikrokristallin bis molekulardispers verteilt ist (382).

Die beiden Isomere des Acetyldigoxins besitzen eine unterschiedliche biologische Verfügbarkeit mit um 30% niedrigeren Plasmadigoxinspiegeln für die α -Form (382). Die Ursache

liegt weder in einer Differenz der Zerfallszeit noch der Lösungsgeschwindigkeit, sondern in der Kristallgröße zuungunsten der voluminösen Kristalle des α -Acetyldigoxins. Das β -Isomer des Digoxinacetylestere ist bei neutralem und alkalischem pH instabil. Es erfolgt eine Umlagerung in die α -Form, die mit zunehmender Temperatur beschleunigt abläuft und bis zur Desacetylierung führen kann (382). Durch diesen Vorgang wird die Bioavailability des β -Acetyldigoxins verschlechtert.

Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption sind die Resultate aus 2 physiko-physiologischen Prozessen: Lösung der Substanz im Magen-Darmsaft und Diffusion einerseits, Zustand der Resorptionsoberfläche andererseits (382). Dabei bestimmt die galenische Zubereitung z.B. eines Digoxinpräparates entscheidend die Resorptionsgeschwindigkeit, diese ihrerseits den therapeutischen Effekt. Ist die Resorptionsgeschwindigkeit zu klein, so wird die erforderliche minimale Wirkkonzentration am Zielorgan, insbesondere an den entsprechenden Rezeptoren nicht erreicht - ist sie zu groß wie z.B. im Digoxin-PVP-Copräzipitat, so kann die minimale toxische Konzentrationsschwelle überschritten werden (440).

Die Resorptionsgeschwindigkeit wirkt sich mehr auf die Schwankungsbreite des Plasmaspiegels und weniger auf die Höhe desselben im steady state aus (382), wobei dieser bereits aus Gründen eines größeren Verteilungsvolumens von 7,78 l/kg (339) gegenüber 0,61 l/kg für Digitoxin und einer kürzeren Eliminations- $t/2$ von 1,4-1,8 Tagen (120,339) gegenüber 4,8-6,8 Tagen für Digitoxin (120,449) eine stärkere Fluktuation aufweisen muß.

Die Digitalisresorption erfolgt hauptsächlich per Diffusion; über die Mitbeteiligung aktiver Transportmechanismen herrscht z.Zt. keine endgültige Klarheit (382). Die Verweildauer der Herzglykoside in bestimmten Darmabschnitten ist von wesentlicher Bedeutung für ihre Resorption. Die Resorptionsdifferenz zwischen Digoxin und Digitoxin beruht darauf, daß letzteres sowohl im proximalen als auch im distalen Darmabschnitt resorbiert wird und zwar vollständig (152,178), während Digoxin nur selektiv in den oberen Darmabschnitten zur

Resorption gelangt (379,380). Die Digoxinresorption wird vermindert durch eine verkürzte Passagezeit bei z.B. angeregter Peristaltik durch Metaclopramid (304), durch eine zu lange Zerfallszeit und zu geringe Lösungsgeschwindigkeit der Digoxin-Spezialität, durch fermentative partielle oder komplette Abspaltung der Zuckerkette des Digoxins im sauren Magensaft (diese Metaboliten unterliegen einer schnelleren Verstoffwechslung mit Inaktivierung durch Glucuronidierung bzw. Epimerisierung (256,257), durch Interferenz mit Cholestyramin (14,70,71,72,157,262) und Neomycin (22,288,318), durch Laxantienabusus (382), beim Malabsorptions-Syndrom (168,206,207), bei Stauungsinsuffizienz (351). Antacida und Speisen reduzieren ebenfalls die Resorptionsgeschwindigkeit, sollen aber nicht das Ausmaß der Resorption herabsetzen (381,392).

Die unterschiedliche Bioavailability verschiedener oraler Digoxinpräparate beschrieben erstmals 1971 anhand von radioimmunchemischen Serumspiegelkontrollen Lindenbaum (287) und Manninen (301). Eine beachtliche Zahl von Publikationen folgte über systematische Analysen nach Einmaldgabe und unter Dauerverabreichung - insbesondere angeregt durch die Änderung des Fabrikationsprozesses für Lanoxin^R der Fa. Bourroughs Wellcome im Jahre 1972, wodurch die Bioverfügbarkeit bei gleichem Digoxingehalt pro Tablette um den Faktor 2 angehoben werden konnte (145,234,382,424,430,431). Während die Digoxinresorption aus alkoholischen Zubereitungen nahezu vollständig und einer i.v. Injektion vergleichbar ist (430), geht aus der nachfolgend summarisch aufgeführten Literatur zu diesem Thema hervor, daß die biologische Verfügbarkeit von Digoxin aus Tabletten - gemessen an der Serumkonzentration, der Zeit-Kurvenfläche und der renalen Glykosidausscheidung - bei gleichem Digoxingehalt direkt proportional der Zerfallszeit und Lösungsgeschwindigkeit der Tabletten ist: (16,23,39,46,99,145,156,179,180,181,182,205,216,222,234,235,237,241,284,285,287,288,289,290,301,303,339,340,356,382,392,395,396,413,424,427,430,431,439,454,466,467).

Kombinationspräparate von Digoxin und koronarwirksamen Substanzen bzw. organischen K^+ - Mg^{++} -Verbindungen haben teils eine unveränderte (340), teils eine herabgesetzte Bioverfügbarkeit gegenüber dem Monopräparat Digoxin (382).

Die Bioavailability kann auch für die i.m. Applikation verschieden, ja sogar ungünstiger als bei der oralen Verabreichung sein, so außer für Digoxin auch für Diazepam (Valium^R), Chlordiazepoxid (Librium^R), Phenytoin (Phenydran^R, Epanutin^R) (262). Digoxin i.m., das für die parenterale Applikation meistens mit dem Lösungsvermittler Propylenglykol versetzt ist, kristallisiert in der Muskulatur aus, wie tierexperimentell nachgewiesen werden konnte; dadurch erfolgt die Gewebsresorption nicht nur verlangsamt, sondern auch unvollständig (262).

Bei der Prüfung der Bioavailability ist zwischen der Beurteilung der absoluten und der relativen Verfügbarkeit zu unterscheiden (382). Für die Testung der absoluten Verfügbarkeit wird die galenische Zubereitung mit einer intravenösen der gleichen Arzneiform in vivo verglichen. Bei der Prüfung der relativen Verfügbarkeit als der Bioavailability im engeren Sinne werden 2 galenische Zubereitungen der gleichen Substanz analysiert. Die Bewertung kann nach einmaliger oder wiederholter Verabreichung erfolgen; die Messung bei repetierter Gabe erfolgt unter Steady-state-Bedingungen. Als Parameter für die einmalige Applikation dienen der partielle Flächenvergleich der Zeit-Plasma-Konzentrationskurve von 0 - 8 Stunden (180), 0 - 6 Stunden (289) oder 0 - 5 Stunden (287,454) und der Eliminationsvergleich der innerhalb von 6 Tagen (182), 4 Tagen (234) oder 10 Tagen (222) kumulativ ausgeschiedenen Glykosidmenge, bzw. nach 9-tägiger Vordigitalisierung mit einer nachfolgenden 3-tägigen Sammelperiode (341), für die wiederholte Applikation der Plasmaspiegelvergleich während des 6. - 14. Tages sowie der Vergleich der renal eliminierten Glykosidmenge während eines Zeitintervalls von 2 Wochen (382).

Nach einmaliger Verabreichung über mehrere $t/2$ zu messen (222), um dadurch eine verlässliche Information über die Gesamtresorption zu erhalten, ist aus methodischen Gründen

wegen der begrenzten Empfindlichkeit des RIA nicht möglich (341,382). So orientiert die Messung in einem initialen Zeitintervall bis zu 8 Stunden vorwiegend über die Resorptionsgeschwindigkeit und weniger über die Resorptionsgröße (179,427). Aus diesen Überlegungen ist es ratsam, die quantitative Urinausscheidung über mehrere Tage als Parameter für die Resorptionsgröße zu berücksichtigen (382). Obgleich der partielle Flächenvergleich des Zeit-Plasmakurvenareals in seiner Aussage begrenzt ist, konnten dennoch günstige Korrelationen mit der kumulativen Urinausscheidung zu allen Vergleichszeiten festgestellt werden (179,234,289,454). Für eine einmalige orale Digoxinapplikation ist jedoch die renale 24-Stunden-Urinausscheidung aussagekräftiger als die Fläche unter der Blutspiegelkurve innerhalb von 8 Stunden (182).

Unter einer Erhaltungsdosis von 0,5 mg Digoxin/d lagen die Plasmaspiegel im steady state 17 Stunden nach der letzten Einnahme zwischen 1,00 und 1,12 ng/ml bei Präparaten mit guter Bioverfügbarkeit und zwischen 0,62 und 0,68 ng/ml bei einer galenischen Zubereitung mit schlechter Bioavailability (356), 24 Stunden nach der letzten Gabe bei $1,17 \pm 0,09$ ng/ml und $0,66 \pm 0,11$ ng/ml (289) oder bei $1,02 \pm 0,05$ ng/ml und $0,68 \pm 0,03$ ng/ml (382). Unter gleicher Dauerverordnung betrugen die mittleren renalen Digoxin-Tagesausscheidungen bei Präparaten mit hoher biologischer Verfügbarkeit zwischen 250 und 280 µg, bei einer Präparation mit schlechter Bioavailability nur 140 µg (356) oder zwischen 224 und 245 µg und nur 157 µg (382).

Die kumulative Urinausscheidung liegt für oral zu verabreichende Digoxinpräparationen (Tabletten, Kapseln, Lösungen) - nicht differenziert zwischen einmaliger und repetierter Gabe - zwischen 41 % und 61 % der deklarierten Dosis (98 ,105,162, 179,222,308), während sie für eine einmalige i.v. Injektion 57 % - 80 % beträgt (98 ,106,179,222). Überwiegend wird eine höhere biologische Verfügbarkeit von Digoxin aus Lösungen als aus Tabletten mitgeteilt (179,222,454), selten eine Gleichwertigkeit (341,430), wobei der Alkoholgehalt der Lösungen nicht immer mitaufgeführt ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die biologische Verfügbarkeit - resultierend aus den physikochemischen Eigenschaften des Medikamentes einerseits und aus dem Funktionszustand des Magen-Darm-Traktes und der Leber andererseits, einschließlich Medikamentinteraktionen - von wesentlichem Einfluß auf die Pharmakokinetik einer Wirksubstanz und als Teil dieser komplexen Kinetik zugleich eine Kenngröße eines Arzneimittels ist. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der in vitro-Löslichkeit des Medikamentes und seiner in vivo-Bioavailability. Subtile in vitro-Methoden, wie z.B. der RIA für Digoxin, ermöglichen Plasmaspiegelmessungen als wesentliche Voraussetzung zur quantitativen Beurteilung der Bioverfügbarkeit. Mit ihrer Hilfe können Äquivalenzdosen verschiedener Präparate ebenso ermittelt werden wie nur mit Hilfe kardiologischer Parameter. Dabei läßt sich auch feststellen, ob die bessere Verträglichkeit mancher Präparate in Wahrheit nicht auf einer geringeren biologischen Verfügbarkeit beruht (420). Eine unterschiedliche Bioverfügbarkeit verschiedener Präparate gleicher Digoxinmenge muß folglich bei der geringen therapeutischen Breite der Digitalisglykoside (382) zu einem quantitativ unterschiedlichen Effekt führen, d.h. zu einer therapeutischen Inäquivalenz (154,424). Unter den Kombinationspräparaten können nur solche eine Einführungschance haben, deren therapeutische Äquivalenz mit dem Monopräparat gesichert worden ist (382). An die Pharmaindustrie ist weniger der Appell nach einer besseren Bioavailability ihrer Präparate als vielmehr nach einer Konstanz derselben zu richten (241,424); nur eine gleichbleibende Bioverfügbarkeit garantiert eine Wirksamkeit und Sicherheit der Behandlung sowie eine genaue und konstante Dosierung. Die Bioavailability wird für den Therapeuten bei der Umstellung eines digitalisierten Patienten auf ein anderes Digoxinpräparat relevant. Über- oder Unterdosierungen können daraus resultieren, ohne daß sich die Glykosidtoleranz des Patienten geändert hätte. Ein auf ein Digoxinpräparat gut eingestellter Patient sollte deshalb mit diesem Medikament weiter-

behandelt werden. Das gilt besonders für die Entlassung aus stationärer Behandlung, wobei die Klinik nicht den generic name, sondern den Markennamen des Präparates im Arztbrief übermitteln sollte.

Eigene Untersuchungen:

Wir haben bei Neueinführung eines β -Acetyldigoxinpräparates gleichen Markennamens während der Aufsättigungs- und der ersten Tage der Erhaltungsphase die Serumdigoxinkonzentrationen mit dem RIA B₂ an 10 erwachsenen Probanden beiderlei Geschlechts mit einem Durchschnittsalter von 38 Jahren (19 - 53 Jahre) gemessen. Die Blutabnahmen erfolgten bei einem konstanten Dosierungsschema - 1.-3. Tag 4 x 1 Tabl., ab 4. Tag 2 x 1 Tabl. à 0,2 mg während der Aufsättigung - 3,5,4 und 12 Stunden und in der Erhaltungsphase 14 Stunden nach der Tabletteneinnahme. Die Summengraphik von 9 Probanden der Abb. 47 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Serumdigoxinkonzentration von 0,05 ng/ml des 1. Tages auf maximal 1,37 ng/ml am 4. Tag; mit Reduktion der Tagesdosis auf die Hälfte der Aufsättigungsphase ab 4. Tag fällt zunächst der Serumspiegel etwas ab und stellt sich zwischen dem 5. und 7. Tag auf eine Konzentration von $1,01 \pm 0,37$ ng/ml ein. (Der Abfall vom 7. zum 8. Tag hat vermutlich eine meßtechnische Ursache; eine Kontrollstudie unter einer mehrwöchigen Dauermedikation ist vorgesehen.)

Der mittlere Digoxinspiegel von 1,01 ng/ml in der frühen Erhaltungsphase mit 0,4 mg/d ist vergleichbar mit den in der Literatur mitgeteilten Serumkonzentrationen für Digoxinpräparate mit günstiger Bioavailabiliy (289,341, 356,382).

Von den 10 Probanden mußte eine 22-jährige Asthenika mit einem Körpergewicht von 48 kg am Ende der 3-tägigen Aufsättigungsphase wegen Emesis als Zeichen einer Digitalisintoxikation aus dem Untersuchungsprogramm ausscheiden. Ihr Digoxinspiegel stieg auf 1,88 ng/ml (Abb. 17). Diese Konzentration wurde von der Asthenika mit kleinerer Muskelmasse als dem Hauptteil am Digoxin-Körperpool und folglich

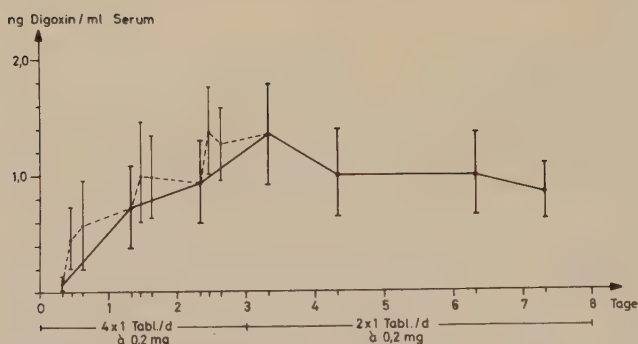


Abb. 47: Serumdigoxinprofil von 9 gesunden freiwilligen Probanden (mittleres Alter 38 Jahre, mittleres Körpergewicht 74 kg) während einer oralen Aufsättigungs- und Erhaltungsdosis mit β -Acetyldigoxin^R. Digoxinbestimmung mit dem RIA B₂. Die ausgezogene Linie repräsentiert die Mittelwerte der Digoxinspiegel am Morgen 12-14 Stunden nach der letzten Acetyldigoxineinnahme, die unterbrochene Linie verbindet Mittelwerte von zwischenzeitlichen Konzentrationsbestimmungen 3,5-4 Stunden nach je 0,2 mg per os. Die vertikalen Balken entsprechen $\pm 1s$ -Streubereichen. Es erfolgt ein kontinuierlicher Anstieg der Serumdigoxinkonzentration in der Aufsättigungsphase und ein geringer Abfall mit anschließender Plateaubildung in der Erhaltungsphase mit halber Dosis.

kleinerem Verteilungsvolumen nicht mehr toleriert. Dieser Digoxinspiegel von noch unter 2 ng ist u.E. der Überlappungszone zwischen therapeutischem und toxischem Bereich zuzuordnen.

9. Statistische Auswertung

Die statistische Bearbeitung der Meßdaten nach arithmetischem Mittel ($\bar{x}$), mittlerem Fehler der Einzelwerte ($\pm s$), Variationskoeffizienten (VK), Korrelationskoeffizienten (r) und Regressionsgeraden (y) erfolgte nach den Angaben von E. Kreyszig: Statistische Methoden und ihre Anwendung, Verlag Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen, 5. Auflage, 1975.

Die Standardabweichung der Einzelwerte wurde nach der Formel

$$\pm s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \bar{x}^2 n}{n-1}}$$

berechnet, wobei

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{ist.}$$

(In allen Formeln ist zu summieren über $i = 1 \dots n$.)

Der Variationskoeffizient resultierte aus der Beziehung

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100.$$

Der Korrelationskoeffizient wurde ermittelt nach der Formel

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{[n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2][n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]}}.$$

Für die Regressionsgerade $y = a + bx$ wurden a und b wie folgt berechnet:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$b = \frac{S_{xy}}{S_x^2}$$

$$S_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

$$S_x^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2$$

Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte nach dem t-Test von Student (Vergleich der Mittelwerte zweier Normalverteilungen) für verbundene Stichproben. Das Vorliegen einer Normalverteilung für die einzelnen Meßreihen wurde zuvor geprüft. Es wurde nach den Angaben von L.Sachs: Angewandte Statistik, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 4. Auflage, 1974, verfahren:

$$t = \frac{(\sum d_i)/n}{\sqrt{\frac{\sum d_i^2 - (\sum d_i)^2/n}{n(n-1)}}}$$

$$d_i = x_i - y_i$$

Die Bearbeitung erfolgte unter Verwendung statistischer Bibliotheksprogramme in der Programmsprache Algol an einem Telefunken TR4 Computer der Zentralen Rechenanlage der Universität Marburg/Lahn ⁺⁾ .

10. Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen galten insbesondere der Qualitätsbeurteilung verschiedener kommerzieller ³H- und ¹²⁵J-RIA zur quantitativen Digoxinbestimmung im Plasma oder Serum und der Vergleichbarkeit ihrer Resultate untereinander. Im einzelnen konnten folgende Feststellungen getroffen werden:

1. Die Bestimmungen der Serum-Digoxinkonzentrationen variieren in 5 verschiedenen RIA bis um den Faktor 2.
2. In Ringversuchen mit anderen Labors weichen die Ergebnisse ebenfalls um das Doppelte ab.
3. Als Ursachen für die Divergenz der Ergebnisse werden der Einfluß der Charcoal-Trenntechnik sowie in ihrer deklarierten Konzentration abweichende Digoxinstandards erkannt.
4. Die Quote der Kreuzreaktionen liegt in den Digoxin-RIA für Digitoxin bei ca. 10% und für Spironolactone selbst bei hoher i.v. und oraler Dosis im subtherapeutischen Bereich.

Es wird deshalb empfohlen:

1. Einstellung nur auf einen RIA für die anfallende ambulante und stationäre Routine-Digoxin-Bestimmung.
2. Erarbeitung von labor-eigenen therapeutischen und toxischen Digoxin-Konzentrationsbereichen und Deklaration derselben.
3. Angabe des angewendeten Digoxin-RIA in Arztbriefen und bei Befundübermittlungen.

⁺⁾ Für die freundliche Unterstützung danken wir den Herren Privatdozent Dr.F.A.Popp, Dipl.-Phys. E.A.Koop, Dipl.-Phys. H.-W.Ridder und K.Christ.

Zur Digoxin-Bestimmung ergeben sich folgende Indikationen:

1. Niereninsuffizienz
2. Ineffiziente Digoxin-Therapie
3. Kontrolle der Digoxin-Einnahme
4. Differenzierung zwischen digoxin-bedingten und primär myokardialen Herzrhythmusstörungen
5. Ärztliches Training in der Digoxin-Therapie
6. Überprüfung der Bioverfügbarkeit von Digoxin-Präparaten.

11. Literatur

1. Abshagen, U., K. von Bergmann, N. Rietbrock: Evaluation of the enterohepatic circulation after ^3H -digoxin administration in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 1 (1972)
2. Abshagen, U., H. Rennekamp: Formation and disposition of bis- and monoglycosides after ^3H -4'''-methyldigoxin administration in man. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279, R 45 (1973)
3. Abshagen, U., N. Rietbrock: Metabolism of digoxigenin, digoxigenin-mono-digitoxoside and digoxigenin-bis-digitoxoside in rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 157 (1973)
4. Abshagen, U., H. Rennekamp, R. K  chler, N. Rietbrock: Formations and disposition of bis- and monoglycosides after administration of ^3H -4'''-methyldigoxin in man. Eur. J. Clin. Pharmacol. 7, 177 (1974)
5. Ackermann, G.L., J.E. Doberty, W.J. Flanagan: Peritoneal dialysis and hemodialysis of tritiated digoxin. Ann. int. Med. 67, 718 (1967)
6. Alberti, K.G., A.A. Shahriari, H.D. Levine, D.P. Lauler: Reversal of ouabain - induced arrhythmias in the dog by intravenous arginine hydrochloride. Cardiovascul. Res. 5, 226 (1971)
7. Allen, J.D., R.G. Shanks, S.A. Zaidi: Effects of lignocaine and propranolol on experimental cardiac arrhythmias. Brit. J. Pharmacol. 42, 1 (1971)
8. Anggard, E.E., L.F. Chew, S.M. Kalman: A source of error in digoxin radioimmunoassay. New Eng. J. Med. 287, 935 (1972)
9. Asplund, J., O. Edhag, L. Mogensen, O. Nyquist, E. Orinius, A. S  jgren: Four cases of massive digitalis poisoning. Acta med. scand. 189, 293 (1971)
10. Bach, E.J., M. Reiter: The difference in velocity between of lethal and ionotropic action of dihydrodigoxin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 248, 437 (1964)
11. Barrett, M.J., P.S. Cohen: Radioimmunoassay of serum renin activity and digoxin concentrations with use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound ligand. Clin. Chem. 18, 1339 (1972)
12. Baum, G.L., M.M. Dick, A. Blum, A. Kaupe, J. Carbollo: Factors involved in digitalis sensitivity in chronic pulmonary insufficiency. Am. Heart J. 57, 460 (1959)

13. Baumgarten, G.: Die herzwirksamen Glykoside. Thieme Verlag Leipzig, 1963
14. Bazzano, G., G.S. Bazzano: Digitalis intoxication: Protection with a new steroidbinding resin. JAMA, 220, 828 (1972)
15. Becker, D.J., P.M. Nonkin, L.D. Bennett, S.G. Kimball, M.S. Sternberg, F. Wasserman: Effect of isoproterenol in digitalis cardiotoxicity. Amer. J. Cardiol. 10, 242 (1962)
16. Beckett, A.H., D.A. Cowan: Digoxin problems. Pharm. J. 209, 174 (1972)
17. Beermann, B., K. Hellström, A. Rosen: The gastrointestinal absorption of ^3H -digoxin. Circulation 44, 139 (1971)
18. Beermann, B.: On the fate of orally administered ^3H -Lanatoside C in man. Europ. J. clin. Pharmacol. 5, 11 (1972)
19. Beermann, B., K. Hellström, A. Rosen, B. Werner: Elimination of orally administered digoxin and digitoxin by thoracic duct drainage in man. Eur. J. clin. Pharmacol. 5, 19 (1972)
20. Beermann, B.: The gastrointestinal uptake of methyl-digoxin- $^{12}\text{-}^3\text{H}$ in man. Eur. J. clin. Pharmacol. 5, 28 (1972)
21. Beermann, B., K. Hellström, A. Rosen: The absorption of orally administered ($^{12}\text{-}^3\text{H}$) digoxin in man. Clin. Sci. 43, 507 (1972)
22. Beermann, B.: Pharmacokinetics of lanatoside C and methyl-digoxin. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
23. Beermann, B.: Value of plasma digoxin estimation. Lancet I, 375 (1973)
24. Beller, G.A., W.B. Hood, T.W. Smith, W.E.C. Wacker: Prevalence of hypomagnesemia in a prospective clinical study of digitalis intoxication. Amer. J. Cardiol. 26, 625 (1970)
25. Beller, G.A., T.W. Smith, W.H. Abelmann, E. Haber, W.B. Hood: Digitalis intoxication: A prospective clinical study with serum level determinations. New. Engl. J. of Med. 284, 989 (1971)
26. Belpaire, F.M., M.G. Bogaert, M.E. de Broe: Radioimmunoassay of digoxin: A comparison different commercial kits in renal failure. In press.
27. Belz, G.G.: Klinisch experimentelle Untersuchungen mit dem Herzglykosid Proscillaridin A unter besonderer Berücksichtigung seiner enteralen Resorptionsquote. Med. Klin. 63, 96 (1968)

28. Belz, G.G., K.O. Vollmer, J.H. Wissler: Zur Hemmwirkung von Herzglykosiden auf die ^{86}Rb -Aufnahme der Erythrozyten. I. Methodische Untersuchungen zur Konzentrationsbestimmung von Agmarin und Digitoxin. Europ. J. clin. Pharmacol. 4, 92 (1972)
29. Belz, G.G., G. Rudolfsky, K. Lossnitzer, G. Wolf, M. Strauch: Plasmaspiegel und Elektrokardiogramm nach intravenöser Applikation von Proscillaridin und Digoxin. Z. Kardiol. 63, 201 (1974)
30. Belz, G.G., G. Rudolfsky, G. Belz: Glykosid-Plasmaspiegel und Elektrokardiogramm während mittelschneller und langsamer Sättigung mit β -Methyldigoxin bei gesunden Probanden. DMW 99, 329 (1974)
31. Belz, G.G.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 46. Herausgeber: H.Jahrmärker. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1975
32. Benthe, H.F., K. Chenpanich: Vergleich der enteralen Wirksamkeit von Digoxin, Acetyldigoxin und Digitoxin. Arzn. Forsch. 15, 486 (1965)
33. Benthe, H.F. K.Chenpanich: Vergleichende Prüfung der enteralen Resorbierbarkeit verschiedener Lanata-Glykoside. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 250, 233 (1965)
34. Benthe, H.F.: Zusammenhang zwischen Lipidlöslichkeit und Resorption verschiedener Digitalisglykoside. In: Probleme der klinischen Prüfung herzwirksamer Glykoside. Herausgeber: K. Greeff et al. Dr. Steinkopff Verlag, Darmstadt 1968
35. Benthe, H.F.: Die Elimination von Digoxin und seinen Acetylderivaten. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R.Schröder und K.Greeff. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1972
36. Bentley, J.D., G.H. Burnett, R.L. Conklin, R.H. Wasserburger: Clinical application of serum digoxin levels: A simplified plasma determination. Circulation 41, 67 (1970)
37. Bertler, A., A. Redfors: An improved method of estimating digoxin in human plasma. Clin. Pharmacol. Therap. 11, 665 (1970)
38. Bertler, A., A. Redfors: Plasma levels of digoxin in relation to toxicity. Acta Pharmacol. 29, 281 (1971)
39. Bertler, A., A. Redfors, S. Medin, L. Nyberg: Bioavailability of digoxin. Lancet II, 708 (1972)

40. Bertler, A., A. Gustafson, P. Ohlin, M. Monti, A. Redfors: Digoxin intoxication and plasma glycosid levels. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
41. Bertler, A., A. Redfors: The ^{86}Rb method for digoxin assay. Comparison with radioimmunoassay. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
42. Binnion, P.F., L.M. Morgan, H.M. Stevenson, E. Fletcher: Plasma and myocardial digoxin concentrations in patients on oral therapy. Brit. Heart J. 31, 636 (1969)
43. Binnion, P.F., L. Morgan, A.M. Pollock, E. Fletcher: Plasma digitoxin levels in a patient on oral therapy. Med. Ann. D.C. 39, 82 (1970)
44. Binnion, P.F., L.M. Morgan: Effect of acute hypokalemia on ^3H -digoxin metabolism. Cardiovascular Res. 5, 431 (1971)
45. Binnion, P.F.: The plasma-digoxin controversy. Lancet I, 535 (1972)
46. Binnion, P.F., M. McDermott: Bioavailability of digoxin. Lancet II, 592 (1972)
47. Binnion, P.F.: Plasma digoxin levels and electrocardiographic changes in man. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, 1973
48. Binnion, P.F.: Plasma and myocardial digoxin levels in dogs and man. Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
49. Binnion, P.F.: Influence of propranolol and diphenylhydantoin on digoxin metabolism. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
50. Binnion, P.F.: Absorption of different commercial preparations of digoxin in the normal human subject, and the influence of antacid, antidiarrheal and ion-exchange resins. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
51. Blankart, R., R. Preisig: Pharmakokinetische Grundlagen der Digitalisdosierung: Eine Studie an Probanden. Schweiz. med. Wschr. 100, 2163 (1970)
52. Bloom, P.M., W.B. Nelp: Relationship of the excretion of tritiated digoxin to renal function. Amer. J. med. Sci. 251, 133 (1966)
53. Bodem, G., H.J. Gilfrich: Digoxinkonzentration im Serum. DMW 97, 632 (1972)

54. Bodem, G., H.J. Gilfrich: Methoden zur Bestimmung von Digoxin und Digitoxin im Blut und ihre klinische Bedeutung. *Klin. Wschr.* 51, 57 (1973)
55. Bodem, G.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 48. Herausgeber: H.Jahrmärker. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975
56. Bolton, A.E., W.M. Hunter: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125-I-containing acylating agent. *Biochem. J.* 133, 529 (1973)
57. Brandt, R., W. Stöcklin, T. Reichstein: Alloglaucotoxinogenin, Strukturbestimmung. *Helv. Chim. Acta* 49, 1662 (1966)
58. Brass, H., H. Philipps: Elimination von α -Acetyl-Digoxin und k-Strophanthin bei Niereninsuffizienz. *Klin. Wschr.* 48, 972 (1970)
59. Broche, B.B., C.A.M. Hogben: Some physico-chemical factors in the drug action. *J. Pharmac.* 9, 345 (1957)
60. Brock, A.: Use of gelatin-coated charcoal in digoxin immunoassay. *Clin. Chem.* 19, 140 (1973)
61. Brooker, G., R.W. Jeliffe: Determination of serum digoxin by enzymatic isotopic displacement of ^3H digoxin from Na-K-ATPase. *Fed. Proc.* 28, 608 (1969)
62. Brooker, G., R.W. Jeliffe: Serum cardiac glycoside assay based upon displacement of ^3H -ouabain from Na-K-ATPase. *Circulation* 45, 20 (1972)
63. Brown, B.T., A. Stafford, S.E. Wright: Chemical structure and pharmacological activity of some derivatives of digitoxigenin and digoxigenin. *Brit. J. Pharmacol.* 18, 311 (1962)
64. Brown, B.T., J.E. Doherty: Tissue concentration of triitated digoxin in dogs after oral administration. *Clin. Res.* 15, 24 (1967)
65. Burckhardt, D., J.S. LaDue: The effect of inorganic phosphate infusion upon digitalis-induced arrhythmias in dogs. *Amer. Heart J.* 75, 364 (1968)
66. Burnett, G.H., R.L. Conklin: The enzymatic assay of plasma digitoxin levels. *J. Lab. clin. Med.* 71, 1040 (1968)
67. Burnett, G.H., R.L. Conklin, G.W. Wasson, A.A. Mac Kinney: Variability of standard curves in radioimmunoassay of plasma digoxin. *Clin. Chem.* 19, 725 (1973)
68. Butler, V.P., J.P. Chen: Digoxin specific antibodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. W.S.* 57, 71 (1967)

69. Butler, V.P.: Assays of digitalis in the blood. Progr. Cardiovasc. Dis. 14, 571 (1972)
70. Caldwell, H.H., N.J. Greenberger: Cholestyramine enhances digitalis excretion and protects against lethal intoxication. J. Clin. Invest. 49, 16 (1970)
71. Caldwell, J.H., N.J. Greenberger: Interruption of enterohepatic circulation of digitoxin by cholestyramine. J. Clin. Invest. 50, 2626 (1971)
72. Caldwell, J.H., C.A. Bush, N.J. Greenberger: Interruption of the enterohepatic circulation of digitoxin by cholestyramine. II. Effect on metabolic disposition of tritium-labeled digitoxin and cardiac systolic intervals in man. J. Clin. Invest. 50, 2638 (1971)
73. Capeller von, D., G.D. Copeland, T.N. Stern: Digitalis intoxication: A clinical report of 148 cases. Ann. Int. Med. 50, 869 (1959)
74. Carroll, P.R., A. Gelbart, M.F. O'Rourke, J. Shortus: Digoxin concentrations in the serum and myocardium of digitalised patients. Aust. NZ. J. Med. 3, 400 (1973)
75. Cerceo, E., C.A. Elloso: Factors affecting the radio-immunoassay of digoxin. Clin. Chem. 18, 539 (1972)
76. Challand, G.S., T. Chard: Quality control in RIA. Clin. Chim. Acta 46, 133 (1973)
77. Chamberlain, D.A., R.J. White, M.R. Howard, T.W. Smith: Plasma digoxin concentration in patients with atrial fibrillation. Brit. Med. J. 3, 429 (1970)
78. Chamberlain, D.A.: Digoxin levels in patients with atrial fibrillation. In: Symposium on Digitalis. Edited by O.Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
79. Chamberlain, D.A.: The ratio between myocardial and plasma levels of digoxin. In: Digitalis symposium. Edited by O.Storstein et al. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
80. Chan, P.C., M.S. Rosenblum: Effect of sulfhydryl group modification on erythrocyte membrane adenosine triphosphatase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 43 (1968)
81. Chard, T.: Observations on the use of a mathematical model in RIA. In: Radioimmunoassay Methods. Edited by K.E.Kirkham and W.M.Hunter. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, 1973
82. Chen, K.K., K.C. Elderfield: Cardiac action of derivatives of Strophanthidin and Cymarin. J. Pharmacol. exp. Ther. 70, 338 (1940)

83. Chen, K.K., Pharmacology: The digitalis group. *Ann. Rev. Physiol.* 7, 677 (1945)
84. Chen, K.K., F.G. Henderson: Pharmacology of sixty-four cardiac glycosides and aglycons. *J. Pharm. exp. Ther.* 111, 365 (1954)
85. Chen, K.K.: Possibilities of further developments in the glycoside structure. First Internat. Pharmacol. Meeting 3, 27 (1961)
86. Chung, E.K., J. Thomas: Arrhythmias caused by digitalis toxicity. *Genetics* 20, 1006 (1965)
87. Chung, E.K.: Digitalis intoxication. *Excerpta Med. Found, Amsterdam*, 95 (1969)
88. Chung, E.K.: The current status of digitalis therapy. *Modern Treatment* 8, 643 (1971)
89. Church, G., L.Schaneroth, N.L. Schwartz, H.J.L. Mariott: Deliberate digitalis intoxication. A comparison of the toxic effects of four glycosides preparations. *Ann. Int. Med.* 57, 946 (1962)
90. Cohn, K.E., K.R.Kleiger, D.C. Harrison: Influence of potassium depletion on myocardial concentration of tritiated digoxin. *Circulation Res.* 20, 473 (1967)
91. Coltart, D.J., M.R. Howard, M. Chamberlain: Myocardial and skeletal muscle concentration of digoxin in patients on longterm therapy. *Brit. med. J.* 2, 318 (1972)
92. Cowley, P.S., F.J. Evans, R.F.A. Ginman: A gas-liquid chromatographic determination of the ratio of gitogenin and digitogenin in mixture. *J. Chromatogr.* 54, 185 (1971)
93. Cox, E., S.E. Wrights: The hepatic excretion of digitalis glycosides and their genins in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 125, 117 (1959)
94. Crane, R.K., D. Miller, J. Bihler: Membran transport and metabolism. Academic Press 1961, N.Y.
95. Csaky, T.Z., H.G. Hartog, G.W. Fernald: Effect of digitalis active intestinal sugar transport. *Am. J. Physiol.* 200, 459 (1961)
96. Curd, J., T.W. Smith, J.C. Jatton, E. Haber: The isolation of digoxin-specific antibody and its use in reversing the effects of digoxin. *Proc. nat. Acad. Sci.* 68, 2401 (1971)
97. Danieli, N., Y. Mazur, F. Sondheimer: The synthesis of digitoxigenin. *Tetrahedron* 22, 3189 (1966)

98. Dengler, H.J., G. Bodem, K. Wirth: Pharmakokinetische Untersuchungen mit dem ^3H -Digoxin und ^3H -Lanatosid C beim Menschen. Arzneimittel-Forsch. 23, 64 (1973)
99. Dengler, H.J.: Die Bedeutung der Pharmakokinetik für die Arzneimitteltherapie. Internist 15, 13 (1974)
100. Dettli, L.: Persönliche Mitteilung
101. Dettli, L.: Arzneimittelelimination bei Niereninsuffizienz. Schw. Rundschau Med. 62, 476 (1973)
102. Dettli, L., P. Sprung: The modifying effects of physiological variables and disease upon pharmacokinetics and for drug response. Proc. 5th Int. Congr. Pharmacol., 3, 165 (1973)
103. Deutscher, R.N., D.C. Harrison, R.H. Goldman: The relation between myocardial ^3H -digoxin concentration and its hemodynamic effects. Amer. J. Cardiol. 29, 47 (1972)
104. Doepf, M., G.L. Fängewisch, S.F. Grebe: Mathematische und experimentelle Untersuchungen zur graphischen Darstellung der RIA-Standardkurven. Nuc-Compact, 3, 72 (1974)
105. Doherty, J.E., W.H. Perkins, G.K. Mitchell: Tritiated digoxin studies in human subjects. Arch. Int. Med. (Chicago) 108, 531 (1961)
106. Doherty, J.E., W.H. Perkins: Studies with tritiated digoxin in human subjects after intravenous administration. Am. Heart J. 63, 528 (1962)
107. Doherty, J.E., W.H. Perkins, W.C. Wilson: Studies with tritiated digoxin in renal failure. Am. J. Med. 37, 536 (1964)
108. Doherty, J.E., W.H. Perkins: Studies following intramuscular tritiated digoxin in human subjects. Am. J. Cardiol. 15, 170 (1965)
109. Doherty, J.E., W.H. Perkins, J. Gammill, J. Sherwood, C. Dodd, C.C. Young: The influence of thyroid function on digoxin metabolism. Ann. Int. Med. 64, 489 (1966)
110. Doherty, J.E., W.H. Perkins: Tissue concentration and turnover of tritiated digoxin in dogs. Amer. J. Cardiol. 17, 47 (1966)
111. Doherty, J.E., W.H. Perkins: Digoxin metabolism in hypo- and hyperthyroidism. Studies with tritiated digoxin in thyroid disease. Ann. intern. Med. 64, 489 (1966)
112. Doherty, J.E., W.J. Flanagan: Tritiated digoxin in human subjects following renal transplantation. Clin. Res. 15, 25 (1967)

113. Doherty, J.E., W.J. Flanigan, W.H. Perkins, G.L. Ackermann: Studies with tritiated digoxin in anephric human subjects. Circulation 35, 298 (1967)
114. Doherty, J.E., W.H. Perkins: The distribution and concentration of tritiated digoxin in human tissue. Ann. Int. Med. 66, 116 (1967)
115. Doherty, J.E.: The clinical pharmacology of digitalis glycosides. A review. Amer. J. Med. Sciences 255, 382 (1968)
116. Doherty, J.E., C.B. Ferrell, E.J. Torobin: Localization of the renal excretion of tritiated digoxin. Am. J. Med. Sci. 258, 181 (1969)
117. Doherty, J.E., W.J. Flanigan, R.M. Patterson: The excretion of tritiated digoxin in normal human volunteers before and after unilateral nephrectomy. Circulation 40, 555 (1969)
118. Doherty, J.E., W.J. Flanigan, M. L. Murphy: Tritiated digoxin XIV: Enterohepatic circulation, absorption and excretion studies in human volunteers. Circulation 42, 867 (1970)
119. Doherty, J.E.: Digitalis serum levels: Clinical use. Ann. Intern. Med. 74, 787 (1971)
120. Doherty, J.E., W.H. Hall, M.L. Murphy, O.W. Beard: New information regarding digitalis metabolism. Dis. Chest. 59, 433 (1971)
121. Doherty, J.E., W.H. Hall: Serum protein binding of digoxin in human subjects. Am. J. of Cardiology 28, 326 (1971)
122. Doherty, J.E., W.J. Flanigan, G.V. Dalrymple: Tritiated digoxin XVII. Excretion and turnover times in normal donors before and after nephrectomy and in the paired recipient of the kidney after transplantation. Amer. J. Cardiol. 29, 470 (1972)
123. Doherty, J.E.: The absorption (resorption), enterohepatic recycling and excretion of tritiated digoxin: Pharmacokinetics and clinical implications. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R. Schröder und K. Greeff, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1972
124. Doherty, J.E.: Digoxin: Present knowledge of pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
125. Doherty, J.E.: Digitalis glycosides. Ann. intern. Med. 79, 229 (1973)

126. Dransfeld, H., K. Greeff: Der Einfluß des Prednison und Prednisolon-bisquanylhydrazons auf die Na^+ - und K^+ stimulierte Membran-ATPase des Meerschweinchens. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. 249, 425 (1964)
127. Dreifus, L.S., E.H. McKnight, M. Katz, W. Likoff: Digitalis intolerance. Geriatrics 18, 494 (1963)
128. Drewes, P.A., V.J. Pileggi: Faster and easier radio-immunoassay of digoxin. Clin. Chem. 20, 343 (1974)
129. Duchateau, M.J.A., Th. von Megen, F.W.H.M. Merkus: Digitoxin radioimmunoassay. Pharmac. Weekblad 108, 193 (1973)
130. Dutta, S., S. Goswami, D.K. Datta, J.O. Lendower, B.H. Marks: The uptake and binding of six radiolabeled cardiac glycosides by guinea-pig hearts and by isolated sarco-plasmic reticulum. J. Pharmacol. Exp. Ther. 164, 10 (1968)
131. Dutta, S., B.H. Marks: Factors that regulate ouabain- ^3H accumulation by the isolated guinea-pig heart. J. Pharmacol. Exp. 170, 318 (1969)
132. Dutta, S., H.M. Rhee, B.H. Marks: Effect of metabolic inhibitors on the accumulation of digitaloids by the isolated guinea-pig heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 180, 351 (1972)
133. Dwenger, A.: Probleme bei der Analyse von Harn- und Organproben beim Nachweis neuer Digoxin-Metabolite. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R. Schröder und K. Greeff. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1972
134. Edens, E.: Die medikamentöse Behandlung der Kreislaufschwäche. Zbl. f. Herz-Gef.-Krkh. 12, 207 (1920)
135. Eickenbusch, W., H. Lahrtz, U. Seppelt, P.A. von Zwieten: Serum concentration and urinary excretion of ^3H -ouabain and ^3H -digitoxin in patients suffering from hyperthyroidism of hypothyroidism. Klin. Wsch. 48, 270 (1970)
136. Elderfield, R.C.: Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe. Festschrift A. Stoll 1947. In: Lettré, Inhoffen, Tschesche, 2. Aufl., 420 (Stuttgart 1954)
137. Erdmann, E., W. Schoner: Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase preparations. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 335 (1974)
138. Erdmann, E., W. Schoner: Eigenschaften des Rezeptors für Herzglykoside. Klin. Wschr. 52, 705 (1974)

139. Erdmann, E.: Bestimmung der Herzglykosidkonzentration im Serum. Internist 16, 185 (1975)
140. Erlanger, B.F., S.M. Beiser: Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. Proc. Acad. Sci. U.S.A. 52, 68 (1964)
141. Evered, D.C., C. Chapman: Plasma digoxin concentration and digoxin toxicity in hospital patients. Brit. Heart J. 33, 540 (1971)
142. Evered, D.C.: The binding of digoxin by the serum proteins. Eur. J. Pharmacol. 18, 236 (1972)
143. Ewy, E.A., G.G. Kapadia, L. Yao, M. Lullin, F.T. Marcus: Digoxin metabolism in the elderly. Circulation 39, 449 (1969)
144. Ewy, G.A., B.M. Groves, M.F. Ball, L. Nimmo, B. Jackson, F.J. Marcus: Digoxin metabolism in obesity. Circulation 44, 810 (1971)
145. Falch, D., A. Teien, C.J. Bjerkelund: Comparative study of the absorption, plasma levels and urinary excretion of the "new" and the "old" lanoxin. Brit. Med. J. 1/5855, 695 (1973)
146. Falch, D.: Determination of digoxin in plasma by radio-immunoassay. J. Oslo City Hosp. 23/2, 35 (1973)
147. Falch, D., A. Teien: The influence of kidney function on the plasma level and urinary excretion of digoxin. In: Symposium of digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
148. Falch, D.: The influence of kidney function, body size and age on plasma concentration and urinary excretion of digoxin. Acta Med. Scand. 194, 251 (1973)
149. Finlay, G.D., T.L. Whitsett, E.A. Cucinell, L.J. Goldberg: Cardiac and renal effects of l-dopa in patients with Parkinson's disease and congestive heart failure. Circulation 42, Suppl. III, 109 (1970)
150. Fisch, C., S.B. Knoebel: Recognition and therapy of digitalis toxicity. Prog. Cardiovasc. Dis. 12, 71 (1970)
151. Fogelman, A.M., J.T. LaMont, S. Finkelstein, E. Rado, M.L. Pearse: Fallibility of plasma-digoxin in differentiating toxic from nontoxic patients. Lancet II, 727 (1971)
152. Forth, W., E. Furukawa, W. Rummel: Intestinal absorption of cardiac glykosides in vitro and in vivo. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Path. 262, 53 (1969)
153. Forth, W., W. Rummel: Vergleichende Untersuchung der intestinalen Resorption von ³H-markierten Herzglykosiden in vitro und in vivo. Tagg. Dtsch. Pharmak. Ges. 1967

154. Forth, W.: Arzneimittel-Wechselwirkungen aus der Sicht des Pharmakologen. Therapiewoche 24, 4716 (1974)
155. Frances, D., M.E. Goroff, F.J. Marcus: The effect of glucose and insuline on the body distribution of ^3H -digoxin. Circulation 44, 152 (1972)
156. Fraser, E.J., R.H. Leach, J.W. Poston: Bioavailability of digoxin. Lancet II, 541 (1972)
157. Gallo, D.G., K.R. Baily, A.L. Sheffner: The interactions between cholestyramin and drugs. Proc. Soc. exp. biol. Med. 120, 60 (1965)
158. Garrett, E.: Theoretische Pharmakokinetik. In: Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie. Herausgeber: H.P. Kuemmerle et al. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1973
159. Gaultier, M., E. Fouriner, M.-L. Eftymion, J. Frejaville, P. Jouannot, M. Dentan: Intoxication digitalique aigüe (70 observations) Bull. Soc. med. Hop. Paris 119, 247 (1968)
160. Geiling, E.M.K., B.J. McIntosh: Biosynthesis of radio-active drugs using carbon-14. Science 108, 558 (1948)
161. Geiling, E.M.K.: Biosynthesis and pharmacology of radio-active digitalis and other medicinally important drugs. Med. Ann. D.C. 20, 197 (1951)
162. Gilfrich, H.J., G.Bodem, C.A. Chidsey: Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digoxin. Arzneimittel-Forschg. 23, 1659 (1973)
163. Gilfrich, H.J., P. Schölmerich: Digitalisintoxikation. Neue Gesichtspunkte zur Entstehung und Bewertung. DMW 100, 831 (1975)
164. Gillmann, H.: Absorption of digitalis glycosides. DMW 96, 1175 (1971)
165. Gjerdrum, K.: Determination of digitalis in blood. Acta med. scand. Vol. 187, 371 (1970)
166. Glynn, J.M.: The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol. Rev. 16, 381 (1964)
167. Gold, H., M. Catbell, T. Greiner, L.W. Hanlon, N.T. Kwit, W. Modell, E. Cotlove, J. Benton, H.L. Otto: Clinical pharmacology of digoxin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 109, 45 (1953)
168. Goldfinger, St., W.D. Heizer, T.W. Smith: Malabsorption of digoxin in malabsorption syndromes. Gastroenterology 58, 952 (1970)

169. Goldsmith, C., G.G. Kapadia, L. Nimmo, C. Murphey, H. Moran, R.J. Marcus: Correlation of digitalis intoxication with myocardial concentration of tritiated digoxin in hypokalemic and normokalemic dogs. Circulation 40, Suppl. 3, 92 (1969)
170. Grahame-Smith, D.G., M.S. Everest: Measurement of digoxin in plasma and its use in diagnosis of digoxin intoxication. Brit. Med. J. 1, 286 (1969)
171. Greeff, K.: Zur Pharmakologie der herzwirksamen Glykoside. Die Wirkung der Glykoside auf den Stoffwechsel des Herzmuskels. Klin. Physiol. 1, 340 (1963)
172. Greeff, K., H. Dransfeld, K. Meng, D. Schwarzmann: Zum Wirkungsmechanismus der neuen herzwirksamen Sterinderivate Prednison und Prednisolonbisguanylhydrazon. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. 247, 341 (1964)
173. Greeff, K., K. Meng, D. Schwarzmann: Digitalis-ähnliche Eigenschaften des Prednison- und Prednisolonbisguanylhydrazons. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. 249, 416 (1964)
174. Greeff, K., F. Schlieper: Artspezifische Wirkungsunterschiede des K-Strophanthins und Prednisolonbisguanylhydrazons. Arch. int. Pharmacodyn. 166, 350 (1967)
175. Greeff, K.: Zum Wirkungsmechanismus der Digitalisglykoside. In: Probleme der klinischen Prüfung herzwirksamer Glykoside. Herausgeber: K. Greeff et al. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1968
176. Greeff, K.: Bestimmungen des Blutspiegels von Digoxin, Digitoxin und g-Strophanthin mit Hilfe radioimmunologischer Methoden. Herz/Kreisl. 6, 145 (1974)
177. Greeff, K.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 47. Herausgeber: H. Jahrmärker, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1975
178. Greenberger, N.J., R.P. MacDermott, J.F. Martin, S. Dutta: Intestinal absorption of 6 tritium labeled digitalis glycosides in rats and guinea pigs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 167, 265 (1969)
179. Greenblatt, D.J., D.W. Duhme, J. Koch-Weser, T.W. Smith: Evaluation of digoxin bioavailability in single-dose studies. New Engl. J. Med. 289, 651 (1973)
180. Greenblatt, D.J.: Intravenous digoxin as a bioavailability standard: Slow infusion and rapid injection. Clin. Pharmacol. Ther. 15, 510 (1974)
181. Greenblatt, D.J., D.W. Duhme, J. Koch-Weser, T.W. Smith: Equivalent bioavailability from digoxin elixir and rapid-dissolution tablets. JAMA 229, 1774 (1974)

182. Greenblatt, D.J., D.W. Duhme, J. Koch-Weser, T.W. Smith: Comparison of one- and six-day urinary digoxin excretion in single-dose bioavailability studies. Clin. Pharmacol. 16, 813 (1974)
183. Greenwood, F.C., W.M. Hunter, J.S. Glover: The preparation of ^{131}I -labeled human growth hormone of high specific activity. Biochem. J. 89, 144 (1963)
184. Greenwood, H., M. Howard, J. London: A rapid, simple assay for digoxin. J. clin. Path. 27, 490 (1974)
185. Groningen, H.E.M., E.S. Slater: The effect of oligomycin on the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated magnesium ATPase of brain microsomes and erythrocyte membrane. Biochem. Biophys. Acta 73, 527 (1963)
186. Gros, E.G., E. Leete: Biosynthesis of plant steroids. II. The distribution of activity in digitoxigenin derived from melanic acid-2-C. J. Am. Chem. Soc. 87, 3479 (1965)
187. Grosse-Brockhoff, F.: Herz- und Gefäßkrankheiten. In: H.Dennig, Lehrbuch der Inneren Medizin, Stuttgart (1957)
188. Grosse-Brockhoff, F., K.-J. Hengels, W.-P. Fritsch, B. Grabensee, T.U. Hausamen: Serumdigoxinspiegel und Nierenfunktion. DMW 98, 1547 (1973)
189. Güllner, H.G., E.B. Stinson, D.C. Harrison, S.M. Kalman: Correlation of serum concentration with heart concentrations of digoxin in human subjects. Circulation 50, 653 (1974)
190. Gutcho, S., H. McCarter, R. Rapun: Radioimmunoassay of digoxin: An intercomparison of results with three methods. Clin. Chem. 19, 1058 (1973)
191. Haan, D., H. Kreuzer: Klinische Methoden. In: Probleme der klinischen Prüfung herzwirksamer Glykoside. Herausgeber: K. Greeff et al. Dr. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1968
192. Haass, A., T. Peter: Determination of external absorption of ^3H -labeled cardiac glycosides by estimating their concentrations in portal and arterial blood and their portal flow in guinea-pigs. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 266, 343 (1970)
193. Haberland, G., G. Maerten: Spezifischer Deuterium- und Tritium-Austausch in Cardenoliden und Cardenolidglykosiden. Naturwiss. 56, 516 (1969)
194. Haberland, G.: Herstellung und Einsatz radioaktiver Glykoside. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R. Schröder und K. Greeff. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1972

195. Haberland, G.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 46 ff. Herausgeber: H. Jahrmärker. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1975
196. Hall, W.H., J.E. Doherty: Tritiated digoxin XVI: Gastric absorption. Ann. J. Dig. Dis. 16, 903 (1971)
197. Hall, W.H., J.E. Doherty: ^3H digoxin absorption in malabsorptive states. Clin. Res. 31, 50 (1973)
198. Hall, C.H.: Critical review of digoxin reagents and methodologies. Lab. Med. 5, 42 (1974)
199. Hamacher, J.: Vergleichende Untersuchungen natürlicher und synthetischer herzwirksamer Substanzen am reproduzierbar toxisch belasteten Herz-Kreislauf-System. Arch. exp. Path. Pharmac. 253, 254 (1966)
200. Hammermann, H., A. Hernandez, D. Goldring: The uptake of ^3H -digoxin by the bundle of his and the myocardium. J. Lab. Clin. Med. 78, 799 (1971)
201. Hansen, O.: The relationship between g-strophanthin-binding capacity and ATPase activity in plasma-membrane fragments from ox brain. Biochem. biophys. Acta (Amst.) 233, 122 (1971)
202. Hargreave, F.E.: Digitalis and cor pulmonale. Br. Med. J. 2, 943 (1965)
203. Harrison, C.E., R.D. Brandenburg, P.R. Ongley, A.L. Orris, C.A. Owen: The distribution and excretion of tritiated substances in experimental animals following the administration of digoxin- ^3H . J. Lab. Clin. Med. 67, 764 (1966)
204. Harrison, D.C., M.D. Robinson, R.E. Kleiger: Role of hypoxia in digitalis toxicity. Amer. J. Med. Sci. 256, 352 (1968)
205. Harter, J.G., J.P. Skelly, A.W. Steers: Digoxin - The regulatory viewpoint. Circulation 49, 395 (1974)
206. Heizer, W.D., S.E. Goldfinger, T.W. Smith, E.Haber: Reduced serum levels in patients with malabsorption syndromes. Am. J. Cardiol. 25, 101 (1970)
207. Heizer, W.D., T.W. Smith, S.E. Goldfinger: Absorption of digoxin in patients with malabsorption syndromes. New Engl. J. Med. 285, 257 (1971)
208. Henderson, F.G., K.K. Chen: Cardiac activity of newer digitalis glykosides and aglycones. J. Med. Clin. 5, 988 (1962)
209. Henderson, G., K.K. Chen: Cardiac glykosides and aglycones by synthesis and mikrobiological conversion. J. Med. Chem. 8, 577 (1965)

210. Henderson, R.R., P.Q. Bessey, W.H. Abelmann, W.B. Stason: Serum digoxin levels in a cardiac outpatient population. A prospective clinical study. *Circulation* 44, 177 (1971)
211. Herrmann, G.R.: Digitoxicity in the aged: Recognition, frequency, and management. *Geriatrics* 21 (3), 109 (1966)
212. Herrmann, J., K. Repke: Über eine neue Form der Konjugation von Geninen im tierischen Stoffwechsel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 243, 333 (1962)
213. Herrmann, J., H.J. Portius, K. Repke: Untersuchungen zur Ursache der Digitalisresistenz der Kröte. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm.* 247, 1 (1964)
214. Herrmann, J., K. Repke: Konjugation von Cardenolidgeninen mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 248, 370 (1964)
215. Herrmann, J., K. Repke: Transformations of cardenolides by microorganismus of the intestine. In: Symposium über biochemische Aspekte der Steroidforschung. Edited by K. Schubert, Akademie Verlag 1969
216. Hibble, A.G., P. Isaac, D.G. Grahame-Smith: Bioavailability of digoxin. *Lancet* 1972/II, 90
217. Hillestad, L., V. Hanstem, L. Hatle, L. Storstein, O.Storstein: Digitalis intoxication. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
218. Hoeschen, R.J., V. Proveda: Serum digoxin by radioimmunoassay. *Can. Med. Assoc. J.* 105, 170 (1971)
219. Holoman, K.N., R.F. Murphy, K.D. Buchanan, D.T. Elmore: Enzymic iodination of polypeptide hormones for RIA. *Clin. Chim. Acta* 45, 153 (1973)
220. Holtzman, J.L., R.B. Shafer, R.R. Erickson: Methodological causes of discrepancies in radioimmunoassay for digoxin in human serum. *Clin. Chem.* 20, 1194 (1974)
221. Horgan, E.D., W.J. Riley: Radioimmunoassay of plasma digoxin, with use of iodinated tracer. *Clin. Chem.* 19, 187 (1973)
222. Huffman, D.H., D.L. Azarnoff: Absorption of orally given digoxin preparations. *J. Amer. Med. Ass.* 222, 957 (1972)
223. Huffman, D.H., D.L. Azarnoff: Pharmakologie und praktische Therapie. Die Anwendung von Digitalisglykosiden. *Internist* 16, 29 (1975)

224. Hundeshagen, H., U. Zeidler, H. Fabel, A. Garbe, H. Nowack: Zur Pharmakokinetik des Peruvids. Arzneimittelforschung 18, 1592 (1968)
225. Hurwitz, N., O.L. Wade: Intensive hospital monitoring of adverse reactions to drugs. Brit. Med. J. I, 531 (1969)
226. Irons, G.V., E.S. Orgain: Digitalis-induced arrhythmias and their management. Progr. cardiovasc. Dis. 8, 540 (1966)
227. Jelliffe, R.W., D.H. Blankenhorn: Gas chromatography of digitoxigenin and digoxigenin. J. Chromatogr. 12, 268 (1963)
228. Jelliffe, R.W., R.G. Stephenson: A fluorometric determination of myocardial digoxin at autopsy, with identification of digitalis leaf, digoxin, and gitoxin. Amer. J. Clin. Path. 51, 347 (1969)
229. Jelliffe, R.W.: Administration of digoxin. Dis. Chest. 56, 56 (1969)
230. Jelliffe, R.W., J. Buell, R. Kolaba: Reduction of digitalis toxicity by computer-assisted glycoside dosage regimes. Ann. Intern. Med. 77, 891 (1972)
231. Jelliffe, R.W., G. Brooker: A nomogram for digoxin therapy. Am. J. Med. 57, 63 (1974)
232. Jöbsis, F.F., J.J. Vreman: Inhibition of a Na^+ - and K^+ -stimulated adenosine triphosphatase by oligomycin. Biochem. Biophys. Acta 73, 346 (1963)
233. Jørgensen, A.W., O.H. Sørensen: Digitalis intoxication. Acta med. scand. 188, 179 (1970)
234. Johnson, B.F.: Biological availability of digoxin from Lanoxin produced in the United Kingdom. Brit. Med. J. 4, 323 (1973)
235. Johnson, B.F., H. Greer, J. McCrerie, C. Bye, A. Fowle: Rate of dissolution of digoxin tablets as a predictor of absorption. Lancet I, 1473 (1973)
236. Johnston, C.I., N.B. Pinkus, M. Down: Plasma digoxin levels in digitalized and toxic patients. Med. J. Aust. 1, 863 (1972)
237. Jounela, A.J., A.A. Sothmann: Bioavailability of digoxin. Lancet I/7796, 202 (1973)
238. Juhász, G., Ch. Tamm: Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen. Helv. Chem. Acta 44, 1063 (1961)

239. Jusko, W.J., M. Weintraub: Myocardial distribution of digoxin and renal function. Clin. Pharmacol. Ther. 16, 449 (1974)
240. Kahn, J.B., G.H. Acheson: Effects of cardiac glycosides and other lactones and of certain other compounds on cation transfer in human erythrocytes. J. Pharmacol. exp. Ther. 115, 305 (1955)
241. Kaufman, G.: Verschiedene Digoxinpräparate. Schweiz. med. Wschr. 103, 1476 (1973)
242. Keyl, A.C., J.R. Suker, H.V. Wessel, P.S. Rhodes: Digitalis antagonism. Arch. intern. Med. 105, 709 (1960)
243. Kim, N.D., L.E. Bailey, P.E. Dresel: Correlation of the subcellular distribution of digoxin with the positive inotropic effect. J. Pharmacol. Exp. Therap. 181, 377 (1972)
244. Klaus, W.: Wirkungsweise und Wirkungsort der Herzglykoside. In: H. Jahrmärker, Digitalistherapie, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1975
245. Koch-Weser, J.D., W. Dühme, D.J. Greenblatt: Influence of serum digoxin concentration measurements on digitoxicity. Clin. Pharmacol. Ther. 16, 284 (1974)
246. Kolenda, K.D., H. Lüllmann, T. Peters, K.V. Seiler: The plasma level, uptake by the liver, and biliary excretion of tritiated cardiac glycosides studied by means of the isolated perfused guinea pig liver. Brit. J. Pharmacol. 41, 648 (1971)
247. Kones, R.J.: Digitalis: Reappraisal of its use after acute myocardial infarction. Cardiol. 59, 1 (1974)
248. Kovarikova, A., H. Kolarow, J. Pitra: Einfluß der 16-Hydroxyl-Gruppe auf die Aktivität der Kardenolide. Die inotrope Aktivität des 16-epi-Gitoxigenin. Experienta 20, 263 (1964)
249. Kramer, P., J. Horenkamp, B. Willms, F. Scheler: Das Kumulationsverhalten verschiedener Herzglykoside bei Anurie. DMW 95, 444 (1970)
250. Kramer, P., F. Scheler: Eliminationskinetische Kriterien für die Auswahl von Herzglykosiden bei Niereninsuffizienz. In: Medikamentöse Therapie bei Nierenerkrankungen. Herausgeber: R. Kluthe, Thieme-Verlag Stuttgart 1971
251. Kramer, P., F. Scheler: Renale Eliminationskinetik verschiedener Herzglykoside. DMW 97, 1485 (1972)
252. Kramer, P., J. Saul, E. Köthe, F. Scheler: Vereinfachte Schnellbestimmung von Plasma-Digoxin. Methodik und klinische Erfahrung. Klin. Wschr. 53, 215 (1975)

253. Kroneberg, G., K. Stoepel: Synthetische Verbindungen mit Digitaliswirkung. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. 249, 393 (1964)
254. Kubasik, N.P., N.S. Norkus, H.E. Sine: Comparison of commercial kits for radioimmunoassay. Clin. Biochem. 7, 307 (1974)
255. Kümmerle, H.P., E.R. Garrett, K.H. Spitzzy: Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie. Urban & Schwarzenberg (2. Auflage), Berlin-München-Wien, 1973
256. Kuhlmann, J., U. Abshagen, N. Rietbrock: Cleavage of glycoside bonds of digoxin and derivatives as function of pH and time. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 149 (1973)
257. Kuhlmann, J., U. Abshagen, N. Rietbrock: Pharmacokinetics and metabolism of digoxigenin-mono-digitoxoside in man. Europ. J. clin. Pharmacol. 7, 87 (1974)
258. Kuno-Sakai, H., H. Sakai, S.E. Ritzmann: Interference of digitoxin with the radioimmunoassay of digoxin. Lancet II, 326 (1972)
259. Kuschinsky, K.: Accumulation of cardiac glycosides. Germ. Med. Mth. 14, 198 (1968)
260. Kuschinsky, K.: Über die Bindungseigenschaften von Plasma-proteinen für Herzglykoside. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 262, 388 (1969)
261. Kuschinsky, G.: Digitalistherapie in der Praxis. DÄ 71, 615 (1974)
262. Kuschinsky, G.: Biologische Verfügbarkeit von Arzneimitteln bei verschiedenen Zufuhrwegen. DÄ 72, 2299 (1975)
263. Lader, S., A. Bye, P. Mardsen: The measurement of plasma digoxin concentration: A comparison of two methods. Europ. J. clin. Pharmacol. 5, 22 (1972)
264. Lader, S., B. Johnson: Interpretation of results obtained using digoxin radioimmunoassay. Postgrad. Med. J. 50, 18 (1974)
265. Langer, G.A.: Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility. Physiol. Rev. 48, 708 (1968)
266. Langer, G.A.: The role of sodium in the regulation of myocardial contractility. J. molec. cell. Cardiol. 1, 1 (1970)
267. Langer, G.A.: Effects of digitalis on myocardial ionic exchange. Circulation 46, 180 (1972)

268. Langer, G.A.: Heart: excitation-contraction. Annu. Rev. Physiol. 35, 55 (1973)
269. Larbig, D., F. Scheler, H.-J. Schmidt, G. Betzien, B. Kaufmann: Untersuchungen zur enteralen Resorption von β -Methyldigoxin. Klin. Wschr. 49, 604 (1971)
270. Larbig, D., K. Kochsiek: Radioimmunchemische Bestimmung von Digoxin im menschlichen Serum. Klin. Wschr. 49, 1031 (1971)
271. Larbig, D., K. Kochsiek, Ch. Schrader: Klinische Aspekte der radioimmunchemischen Bestimmung der Serum-Digoxinkonzentration. DMW 97, 1389 (1972)
272. Larbig, D., K. Kochsiek: Zur radioimmunchemischen Bestimmung von Digoxin und Digoxinderivaten. DMW 97, 1310 (1972)
273. Larbig, D.: Neues zur Digitalistherapie. Physik. Medizin und Rehabilitation 14, 203 (1973)
274. Larbig, D.: Diskussionsbemerkung. In: Digitalistherapie, S. 48 ff. Herausgeber: H. Jahrmärker. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1975
275. Larson, S.M., Y.J. Thorell: Die Prinzipien von kompetitiven Radio-Assays. Med. Lab. 28, 51 (1975)
276. Lauterbach, F.: Über Mechanismus und Umfang der enteralen Resorption und den enterohepatischen Kreislauf von Herzglykosiden. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 245, 67 (1963)
277. Lauterbach, F., G. Vogel: Die Abhängigkeit der enteralen Wirkungsquote kardiotoner Steroide von der angebotenen Dosis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 259, 248 (1968)
278. Lauterbach, F.: Metabolismus und enterale Resorption herzwirksamer Glykoside. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 263, 26 (1969)
279. Leete, F., G. Gregory, E.G. Gros: Biosynthesis of plant steroids. I. The origin of the butenolide ring of digitoxigenin. J. Am. Chem. Soc. 87, 3475 (1965)
280. Lely, A.H., C.H. van Enter: Large-scale digitoxin intoxication. Brit. Med. J. 3, 737 (1970)
281. Lely, A.H., C.H. van Enter: Non-cardiac symptoms of digitalis intoxication. Amer. Heart J. 83, 149 (1972)
282. Lendle, L.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Berlin 1935

283. Levy, G., T. Tsuchiya: Effect of activated charcoal on aspirin absorption in man. Clin. Pharm. and Therap. 13, 317 (1972)
284. Levy, G., M. Gibaldi: Bioavailability of drugs. Circulation 49, 391 (1974)
285. Lewis, R.P.: Absorption patterns of digoxin tablets (DT) and elixier (DE) in normal subjects. Circulation 46, 182 (1972)
286. Linde, M.M.A., pharmakol. Institut, Basel: persönliche Mitteilung
287. Lindenbaum, J., M.H. Mellow, M.O. Blackstone, V.P. Butler: Variation in biologic availability of digoxin from four preparations. New Eng. J. Med. 285, 1344 (1971)
288. Lindenbaum, J., K.M. Maulitz, J.R. Saha, N. Shea, V.P. Butler: Impairment of digoxin absorption by neomycin. Clin. Res. 20, 410 (1972)
289. Lindenbaum, J., V.P. Butler: Correlation of digoxin-tablet dissolution-rate with biological availability. Lancet I, 1215 (1973)
290. Lindenbaum, J.: Bioavailability of digoxin tablets. Pharmacol. Rev. 25, 229 (1973)
291. Love, W.D., G.E. Burch: A comparison of potassium⁴², rubidium⁸⁶ and cesium¹³⁴ as tracers of potassium in the study of cation metabolism of human erythrocytes in vitro. J. Lab. Clin. Med. 41, 351 (1953)
292. Lowenstein, J.M.: A method for measuring plasma levels of digitalis glycosides. Circulation 31, 228 (1965)
293. Lowenstein, J.M., E.M. Corril: An improved method for measuring plasma and tissue concentrations of digitalis glycosides. J. Lab. clin. Med. 67, 1048 (1966)
294. Lown, B., J.M. Weller, N. Wyatt, R. Hoigne, J.P. Merrill: Effects of alterations of body potassium on digitalis toxicity. J. Clin. Invest. 31, 648 (1952)
295. Lüllmann, H., T. Peters, P.A. van Zwieten: The distribution of ³H-labeled cardenolides between isolated guinea-pig atrial tissue and circulating, oxygenated whole blood. Brit. J. Pharmacol. 36, 276 (1969)
296. Lukas, D.S., R.E. Peterson: Determination of digitoxin in plasma by double isotope dilution derivative assay. J. Clin. Invest. 43, 1242 (1964)
297. Lukas, D.S., R.E. Peterson: Double isotope dilution derivative assay of digitoxin in plasma, urine, and stool of patients maintained on the drug. J. clin. Invest. 45, 782 (1966)

298. Lukas, D.S., A.G. De Martine: Binding of Digitoxin and some related cardenolides to human plasma proteins. *J. clin. Invest.* 48, 1041 (1969)
299. Lukas, D.S.: Some aspects of the distribution and disposition of digitoxin in man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 179, 338 (1971)
300. Lukas, D.S.: The pharmacokinetics and metabolism of digitoxin in man. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
301. Manninen, V., J. Melvin, G. Härtel: Serum digoxin concentrations during treatment with different preparations. *Lancet* II, 934 (1971)
302. Manninen, V., A. Apajalahti, J. Melvin, M. Karesoja: Altered absorption of digoxin in patients given propantheline and metoclopramide. *Lancet* I, 398 (1972)
303. Manninen, V., K. Ojala, P. Reissell: New formulation of digoxin. *Lancet* II, 922 (1972)
304. Manninen, V., A. Apajalahti, J. Melvin, M. Karesoja: Altered absorption of digoxin in patients given propantheline and metoclopramide. *Lancet* I, 398 (1973)
305. Marcus, F.J., G.G. Kapadia: The metabolism of tritiated digoxin in cirrhotic patients. *Gastroenterology* 47, 517 (1964)
306. Marcus, F.J., G.J. Kapadia, G.G. Kapadia: The metabolism of digoxin in normal subjects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 145, 203 (1964)
307. Marcus, F.J., A.S. Peterson, A. Saled, J. Scully, G.G. Kapadia: The metabolism of tritiated digoxin in renal insufficiency in dogs and man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 152, 372 (1966)
308. Marcus, F.J., L. Burkhalter, C. Cuccia, J. Pavlovich, G.G. Kapadia: Administration of tritiated digoxin with and without a loading dose: A metabolic study. *Circulation* 34, 865 (1966)
309. Marcus, F.J., J. Pavlovich, M. Lullin, G. Kapadia: The effect of reserpine on the metabolism of tritiated digoxin in the dog and in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159, 314 (1968)
310. Marcus, F.J., G.G. Kapadia, C. Goldsmith: Alteration of the body distribution of tritiated digoxin by acute hyperkalaemia in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 165, 136 (1969)

311. Marcus, F.J., L. Nimmo, G.G. Kapadia, C. Goldsmith: The effect of acute hypokalemia on the myocardial concentration and body distribution of tritiated digoxin in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178, 271 (1971)
312. Marcus, F.J.: Factors determining digitalis dosage. In: *Basic and clinical pharmacology of digitalis*. Thomas, Springfield/III., 1972
313. Marcus, F.J.: Metabolism of digoxin in normal man and factors influencing the body distribution. In: *Symposium on digitalis*. Edited by O.Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
314. Marschner, I., F. Erhardt, P.C. Scriba: The calculation of the RIA standard curve by spline function. In: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*. IAEA, Vienna, 1974
315. Mason, D.F., K. Zelis, G. Lee, J.L. Hughes, D.F. Spann, E.A. Amsterdam: Current concepts and treatment of digitalis toxicity. *Amer. J. Cardiol.* 27, 546 (1971)
316. Mason, D.T.: Digitalis pharmacology and therapeutics: Recent advances. *Ann. Intern. Med.* 80, 520 (1974)
317. Matsui, H., A. Schwartz: Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na-K)-dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochem. Biophys. Acta* 157, 655 (1968)
318. Maulitz, R.M., J. Lindenbaum, J.R. Saha, N. Shea, V.P. Butler: Impairment of digoxin absorption by neomycin. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 48, 1047 (1972)
319. Meade, R.C., T.J. Kleist: Improved radioimmunoassay of digoxin and other sterol-like compounds using Somogyi precipitation. *J. Lab. Clin. Med.* 80, 748 (1972)
320. Medzihradsky, F., P.S. Nandhasri, U. Khanna: Enzymatic determination of cardiac glycosides. *Biochem. Med.* 5, 285 (1971)
321. Megges, R., K. Repke: Über Faktoren, welche die orale Wirksamkeit von Herzglykosiden bestimmen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 241, 534 (1961)
322. Megges, R., K. Repke: Improved intestinal absorption of polar glycosides by acylation. *Proc. 1st International Pharmacological Meeting*, Vol. 3, Pergamon Press, Oxford 1963
323. Miller, R.R.: Hospital admissions due to adverse drug reactions. *Arch. Intern. Med.* 134, 219 (1974)
324. Morgan, L.M., P.F. Binnion: The distribution of ³H-digoxin in normal and acutely hyperkalaemic dogs. *Cardiovascular Res.* 4, 235 (1970)

325. Morrison, J., T. Killip, W.B. Stason: Serum digoxin levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass. Circulation 42, 110 (1970)
326. Morrison, J., T. Killip: Hypoxemia and digitalis toxicity in patients with chronic lung disease. Circulation 44, 41 (1971)
327. Morrison, J., T. Killip: Serum digitalis levels in patients with acute myocardial infarction. Clin. Res. 19, 353 (1971)
328. Morrow, D.H., N.T. Townley: Anaesthesia and digitalis toxicity: An experimental study. Anesth. Analg. 43, 510 (1964)
329. Müller, H., E.H. Graul: Diganostik mit Radioimmunoassays. DA 71, 854 (1974)
330. Müller, H.: Unveröffentlichte Beobachtung.
331. Müller, H., F. Jost, E.H. Graul, H.-W. Ridder, H. Bräuer, K. Christ: Digoxin-RIA mit immobilisiertem Antikörper - Vergleich mit einer Charcoal-Methode. Nuc-Compact. Im Druck
332. Müller, H., E.H. Graul, H.Bräuer: Different results in the estimation of digoxin by various RIA. Europ. J. Clin. Pharm. In press
333. Müller, H., E.H. Graul, E.A. Koop: Unterschiedliche Standardkonzentrationen als Ursache für divergierende Serum-digoxinbestimmungen mit RIA. Fortschr. Röntgenstr. Im Druck
334. Müller, H., E.H. Graul: Diverse Fehlerquellen bei der radioimmunchemischen Digoxinbestimmung im Serum. Nuclear-medicin. Im Druck
335. Müller, H., U. Schmidt, F. Jost, K. Joseph, H.H. Pries, H. Bräuer: Beitrag zur Quantifizierung von Kreuzreaktionen im Digoxin-RIA. Nuc-Compact 1. Dr.
336. National Prescription Audit. 9th Edition, Gosselin, R.A. and Co. P.A. Ambler, 1972
337. Neff, M.S., S. Mendelsohn, K.E. Kevan, S. Bannack, C. Schwartz, R.H. Selber: Magnesium sulphate in digitalis toxicity. Amer. J. Cardiol. 29, 377 (1972)
338. Nola, G.T., J. Pope, D.C. Harrison: Assessment of the synergistic relationship between serum calcium and digitalis. Amer. Heart J. 79, 499 (1970)
339. Nyberg, L., K.-E. Andersson, A. Bertler: Bioavailability of digoxin from tablets. II. Radioimmunoassay and disposition pharmacokinetics of digoxin after intravenous. Acta Pharm. Suecia 11, 459 (1974)

340. Ochs, H., G. Bodem, H.J. Dengler: Die biologische Verfügbarkeit von Digoxin aus Kombinationspräparaten. Klin. Wschr. 52, 637 (1974)
341. Ochs, H., G. Bodem, E. Hahn, H.J. Dengler: Verschiedene Untersuchungen der biologischen Verfügbarkeit von Digoxin aus Tabletten und Lösungen im Langzeitversuch. Klin. Wschr. 53, 425 (1975)
342. Ogilvie, R.J., J. Reudy: Adverse drug reactions during hospitalization. Can. Med. Assoc. J. 97, 1450 (1967)
343. Ogilvie, R.J., J. Reudy: An educational program in digitalis therapy. JAMA 222, 50 (1972)
344. Ohnhaus, E.E., P. Spring, L. Dettli: Protein binding of digoxin in human serum. Eur. J. Clin. Pharmacol. 5, 34 (1972)
345. Ohnhaus, E.E., P. Spring, L. Dettli: Eliminationskinetik und Dosierung von Digoxin bei Patienten mit Niereninsuffizienz. DMW 99, 1797 (1974)
346. Okita, G.T., S.E. Kelsey, P.J. Talso, L.B. Smith, E.M.K. Geiling: Studies on the renal excretion of radioactive digitoxin in human subjects with cardiac failure. Circulation 7, 161 (1953)
347. Okita, G.T., P.J. Talso, J.H. Curry, F.D. Smith, E.M.K. Geiling: Metabolic fate of radioactive digitoxin in human subjects. J. Pharmacol. Exp. Ther. 115, 371 (1955)
348. Okita, G.T.: Species difference in duration of action of cardiac glycosides. Fed. Proc. 26, 1125 (1967)
349. Oliver, G.C., B.M. Parker, D.L. Brasfield: The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. J. clin. Invest. 47, 1035 (1968)
350. Oliver, G.C., B.M. Parker, C.W. Parker: Radioimmunoassay for digoxin. Technik und clinical application. Amer. J. Med. 51, 186 (1971)
351. Oliver, G.C., R. Taxman, R. Frederickson: Influence of congestive heart failure on digoxin blood levels. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
352. Perrin, L., J. Fabre: Mikrosomale Enzyme der Leber und Medikamente. Medizin und Pharmazie 109, 600 (1971)
353. Peters, U., T.V. Hausamen, F. Grosse-Brockhoff: Einfluß von Tuberkulostatika auf die Pharmakokinetik des Digitoxins. DMW 99, 2381 (1974)

354. Peters, U., T.U. Hausamen, F. Grosse-Brockhoff: Therapie mit Digitoxin unter Kontrolle des Serum-Digitoxinspiegels. DMW 99, 1701 (1974)
355. Philipps, A.P.: The improvement of specificity in radio-immunoassays. Clin. Acta 44, 333 (1973)
356. Preibisz, II., V.P. Butler, J. Lindenbaum: Digoxin tablet bioavallability: Single-dose and steady state assessment. Ann. Intern. Med. 81, 469 (1974)
357. Prindle, K.H., C.L. Skelton, S.E. Epstein, F.I. Marcus: Influence of extracellular potassium concentration on myocardial uptake and inotropic effect of tritiated digoxin. Circulation Res. 28, 337 (1971)
358. Rapoport, S.M.: Med. Biochemie, Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1965
359. Rasmussen, K., J. Jerwell, O. Storstein: Clinical use of a bio-assay of serum digitoxin activity. Eur. J. Clin. Pharmacol. 3, 236 (1971)
360. Rasmussen, K., J. Jerwell, L. Storstein, K. Gjerdrun: Digitoxin kinetics in patients with impaired renal function. Clin. Pharmacol. Ther. 13, 6 (1972)
361. Redfors, A.: Plasma digoxin concentration its relation to digoxin dosage and clinical effects in patients with atrial fibrillation. Brit. Heart J. 34, 383 (1972)
362. Redfors, A., A. Bertler, H. Schüller: The ratio between myocardial and plasma levels of digoxin in man. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
363. Reichstein, R.: Cardenolid- und Pregnanglykoside. Naturwiss. 54, (H3), 53 (1967)
364. Rendi, R.: Sodium, potassium-requiring adenosine-tri-phosphatase activity. II. Mechanism of inhibition by sulphydryl reagents. Biochim. Biophys. Acta 99, 564 (1965)
365. Repke, K.: Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 233, 271 (1958)
366. Repke, K.: Glykosidspaltungen im Tierkörper. Naturwiss. 46, 173 (1959)
367. Repke, K., H.J. Portius: Über die Identität der Ionen-pumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. Experienta 19, 452 (1963)

368. Repke, K.: Metabolism of cardiac glycosides. In: New aspects of cardiac glycosides. Editors: W. Wilbrandt and P. Lindgren. N.Y., Macmillan, 1963
369. Repke, K.: Über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis. Klin. Wschr. 42, 157 (1964)
370. Repke, K., M. Est, H.J. Portius: Über die Ursache der Speziesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit. Biochem. Pharmacol. 14, 1785 (1965)
371. Repke, K.: Biochemie und Klinik der Digitalis. Internist, 7, Heft 8 (1966)
372. Repke, K.: Biochemische Grundlagen der Entwicklung neuartiger Herzmittel des Digitalistyps. Pharmacie 27, 11 (1972)
373. Repke, K., R. Schön: Flip-flop-model of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ function. Acta Biol. med. germ. 31, 19 (1973)
374. Repke, K., I. Herrmann, R. Kunze, H.J. Portius, R. Schön, W. Schönfeld: Mechanism of digitalis action and the importance of the kinetics of the formation and decomposition of glycoside-receptor complex for understanding of overall pharmacokinetics of digitalis compounds. In: Symposium on digitalis. Edited by O. Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
375. Reuning, R.H., R.H. Sams, R.E. Notari: Role of pharmacokinetics in drug dosage adjustment. I. Pharmacological effect, Kinetics and apparent volume of distribution of digoxin. J. clin. Pharmacol. 13, 127 (1973)
376. Rhodes, Th.F., O.F. Thomas, M.J. DeMev: Comparison of patient serum digoxin concentrations obtained by different radioimmunoassay digoxin kits. In press.
377. Rider, A.K., H.P. Schedl, G. Nokes, Str. Shining: Small intestinal glucose transport. J. Gen. Physiol. 50, 1173 (1967)
378. Riegelman, S.: Physiological and pharmacokinetic complexities in bioavailability testing. Pharmacology 8, 118 (1972)
379. Rietbrock, N., U. Abshagen, K. von Bergmann: Rationelle Therapie mit Digoxin und Derivaten, Grundlagen der Therapie. Symposium d. Ärztekammer Hamburg, 1971
380. Rietbrock, N., U. Abshagen, K. von Bergmann, H. Kewitz: Pharmacokinetics of digoxin and its 4'''-Acetyl- and Methylderivates in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 171 (1972)

381. Rietbrock, N., U. Abshagen: Stoffwechsel und Pharmakokinetik der Lanataglykoside beim Menschen. DMW 98, 117 (1973)
382. Rietbrock, N.: Therapeutische Gleichwertigkeit und Ungleichwertigkeit chemisch identischer Stoffe (insbesondere am Beispiel der Herzglykoside). 9. Deidesheimer Gespräche (26.-27.4.75)
383. Risler, T., B. Grabensee, T.-U. Hausamm, E. Schröder, F. Grosse-Brockhoff: Digoxin-Clearance bei Nierengesunden und bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion. Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch. 40, 306 (1974)
384. Risler, T., B. Grabensee, F. Grosse-Brockhoff: Ekg-Veränderungen und Digoxin-Serum Konzentration bei Digitalisintoxikationen. DMW 100, 821 (1975)
385. Rodbard, D., G.H. Weiss: Mathematical theory of immunoradiometric assays. Anal. Biochem. 52, 10 (1973)
386. Rodbard, D., D.M. Hutt: Statistical analysis of RIA and immunoradiometric assays. In: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. IAEA, Vienna, 1974
387. Rodensky, P.L., F. Wassermann: Observations on digitalis intoxication. Arch. Int. Med. 108, 171 (1961)
388. Rotlin, E., R. Bircher: Pharmakodynamische Grundlagen der Therapie mit herzwirksamen Glykosiden. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 5, 457 (1954)
389. Ruiz-Torres, A., H. Burmeister: Stoffwechsel und Kinetik von β -Acetyldigoxin. Klin. Wsch. 50, 191 (1972)
390. Ruiz-Torres, A.: Stoffwechsel und Kinetik von Herzglykosiden. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R. Schröder und K. Greeff. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1972
391. Russell, J.A., C.D. Klaassen: Biliary excretion of cardiac glycosides. J. Pharmacol. exp. Ther. 186, 455 (1973)
392. Sanchez, N., L.B. Sheiner, H. Halkin, K.L. Melmon: Pharmacokinetics of digoxin: Interpreting bioavailability. Brit. Med. J. 4, 132 (1973)
393. Seifert, G., H.-J. Schäfer, A. Schulz: Die Bedeutung des intrazellulären Calciumtransportes für die Zellfunktion. DMW 100, 1854 (1975)
394. Shapiro, S., D. Slone, G.P. Lewis, H. Pick: The epidemiology of digoxin. J. chron. Dis. 22, 361 (1969)

395. Shaw, T.R.D., M.R. Howard, J. Hammer: Variation in the biological availability of digoxin. Lancet II, 303 (1972)
396. Shaw, T.R.D., J.E. Carless: The effect of particle size on the absorption of digoxin. Europ. J. clin. Pharmacol. 7, 269 (1974)
397. Shrager, M.W.: Digitalis intoxication: A review and report of forty cases with emphasis on etiology. Arch. Int. Med. 100, 881 (1957)
398. Smith, T.W., V.P. Butler, E. Haber: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay. New Engl. J. Med. 281, 1212 (1969)
399. Smith, N.T., A.N. Corbascio: The use and misuse of pressor agents. Anesthesiology 33, 58 (1970)
400. Smith, T.W., V.P. Butler jr., E. Haber: Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside. Biochemistry 9, 331 (1970)
401. Smith, T.W., E. Haber: Digoxin intoxication: The relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration. J. clin. Invest. 49, 2377 (1970)
402. Smith, T.W., J.T. Willerson: Suicidal and accidental digoxin ingestion: Report of five cases with serum digoxin level correlation. Circulation 44, 29 (1971)
403. Smith, T.W.: Contribution of quantitative assay techniques to the understanding of the clinical pharmacology of digitalis. Circulation 46, 188 (1972)
404. Smith, T.W.: Contribution of quantitative assay techniques to the understanding of the clinical pharmacology of digitalis. Circulation 46, 188 (1972)
405. Smith, T.W.: New approaches to the management of digitalis intoxication. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, 1973
406. Smith, T.W.: Drug therapy: Digitalis glycosides. New Engl. J. Med. 288, 719 (1973)
407. Smith, T.W.: Measurement of cardiac glycoside concentrations in serum or plasma. Technical problems and clinical implications. In: New techniques in tumor localization and radioimmunoassay. Edited by M.N. Croll et al. J. Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto, 1974
408. Smith, T.W.: Serum toxicity. Epidemiological and clinical use. The Am. J. of Med. 58, 470 (1975)
409. Sodeman, W.A.: Diagnosis and treatment of digitalin toxicity. New Engl. J. Med. 273, 35 and 93 (1965)

410. Soffer, A.: The changing picture of digitalis intoxication. Arch. Int. Med. 107, 681 (1961)
411. Somogyi, J.: Die klinische Bedeutung der Transport-Adenosinetriphosphatase. Med. Welt 26, 1076 (1975)
412. Somylo, A.P.: The toxicology of digitalis. Amer. J. Cardiol. 5, 523 (1960)
413. Sorby, D.L., T.N. Tozer: On the evaluation of biologic availability of digoxin from tablets. Drug. Intel. Clin. Pharm. 7, 78 (1973)
414. Spona, J.: Wertigkeit radioimmunologischer Methoden in Gynäkologie und Geburtshilfe. 12. Jahrestagung der Gesellsch. f. Nuclearmedizin, München (11.-14.9.74)
415. Spratt, J.L., G.T. Okita: Proteinbinding of radioactive digitoxin. J. Pharmacol. exp. Ther. 124, 108 (1958)
416. Szekeley, P., N.A. Wynne: The effects of magnesium on cardiac arrhythmias caused by digitalis. Clin. Sci. 10, 241 (1951)
417. Schall, R.F.: Digoxin radioimmunoassay: Dealing with a loss of sensitivity. Clin. Chem. 19, 688 (1973)
418. Schatzmann, H.J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran. Helv. Physiol. Acta 11, 346 (1953)
419. Schaumann, W., F. Zielske, K. Kobler, K. Koch: β -Methyl-digoxin. III. Speed of absorption in guinea pigs in comparison to other cardiac glycosides. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 272, 32 (1972)
420. Schaumann, W.: Die Pharmakokinetik von Digitalis-Glykosiden und ihre Bedeutung für die Therapie. Therapiewoche 23, 2894 (1973)
421. Schedl, H.P., J.A. Clifton: Small intestinal absorption of steroids. Gastroenterology 41, 491 (1961)
422. Scheler, F.: Persönliche Mitteilung
423. Scheler, F., W. Wigger, D. Höffler, E. Quellhorst: Steigerung der Digitalistoxizität bei eingeschränkter Nierenfunktion. DMW 90, 1614 (1965)
424. Schmidt, R.: Bioavailability - Aspekte für die Praxis. Schw. Rundschau Med. 63, 697 (1974)
425. Schneider, K.W., W. Gattenlöhner, L. Pippig: Die Veränderung hämodynamischer Größen bei kardiovaskulär dekompensierten und Herzkreislaufgesunden unter Prednison-Bisguanilhydrazon. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. 253, 84 (1966)

426. Schott, A.: Observations on digitalis intoxication - a plea. Postgrad. Med. J. 40, 628 (1964)
427. Schumacher, G.E.: Keeping bioavailability in perspective. Am. J. Hosp. Pharm. 30, 150 (1973)
428. Schwiegk, H., H. Jahrmärker: Therapie der Herzinsuffizienz. In: Handbuch der Inneren Medizin 9/1, (1960), Berlin, Göttingen, Heidelberg
429. Steiness, E.: Renal excretion of digoxin. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
430. Steiness, E., V. Christensen, H. Johansen: Bioavailability of digoxin tablets. Clin. Pharmacol. Ther. 14, 949 (1973)
431. Stewart, M.J., E. Simpson: New formulation of Lanoxin: Expected plasma levels of digoxin. Lancet II, 541 (1972)
432. Stoll, R.G., M.S. Christensen, E. Sakmar, J.G. Wagner: The specificity of the digoxin radioimmunoassay procedure. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm. 4, 503 (1972)
433. Stoll, A., E. Jucker: Heteroside, Aufbau und Vorkommen. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie. Bd. 6, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958)
434. Storstein, L.: The ratio between myocardial and serum levels of digitoxin. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
435. Storstein, L.: Paper and thin layer chromatographic. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
436. Storstein, L.: The influence of renal function on the pharmacokinetics of digitoxin. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
437. Storstein, L., O. Mjølnerød: Excretion of digitoxin in cholecystectomized patients with T-tube drainage. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo 1973
438. Storstein, O.: Digitoxin: Present knowledge of pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Symposium on digitalis. Edited by O.Storstein, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 1973
439. Strobach, H., K. Greeff, F.A. Forster, W. Wildmeister: Radioimmunologische Glykosidbestimmungen nach Gabe von Digoxin und Digoxinderivaten beim Menschen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 274, 113 (1972)

440. Strobach, H.: Methodische Erfahrungen beim Radioimmunoassay. In: Digitalistherapie. Herausgeber: H. Jahrmärker Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1975.
441. Stupak, E.I., Th.R. Bates: Enhanced absorption of digitoxin from orally administered digitoxin-polyvinylpyrrolidone coprecipitates. J. Pharmaceut. Science 62, 1806 (1973)
442. Tamm, C., A. Gubler: Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen. II. Umsetzung von Aglykonen und Glykosiden mit *Fusarium lini* (Bolley). Helv. Chim. Acta 42, 239 (1959)
443. Tamm, C.: The stereochemistry of the glycosides in relation to biological activity. First Intern. Pharmak. Meeting 3, 11 (1961)
444. Tan, L.: An improved method for the gas chromatographic identification of digitalis cardenolides. J. Chromatogr. 45, 68 (1969)
445. Titus, E.D.: Characterization of pharmacological receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 269 (1975)
446. Towbin, E.J., J.E. Doherty, C.B. Ferrell: Renal excretion of tritiated digoxin. Circulation, Sup. 3, 30, 170 (1964)
447. Towakhol, A.A., D.O. Nutter, R.A. Massumi: A prospective study of digitalis toxicity in a large city hospital. Med. Ann. D.C. 36, 402 (1967)
448. Vick, R.L., J.B. Kahn, G.H. Acheson: Effects of dihydroouabain, dihydro-digoxin and dihydro-digitoxin on the heart-lung preparation of the dog. J. Pharmacol. exp. Ther. 121, 330 (1957)
449. Vöhringer, H.F., N. Rietbrock: Metabolism and excretion of digitoxin in man. Clin. Pharmac. and Ther. 16, 796 (1974)
450. Vogt, W.: Resorption von Pharmaka durch Diffusion. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac. 250, 210 (1965)
451. Vogt, W., B. Popp, M. Knedel: Computerprogramm zur Ergebnisberechnung von RIA. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 438 (1973)
452. Voigtländer, W., W. Schaumann, K. Koch, F. Zielske: - Methyl-Digoxin IV. Blood levels, tissue distribution and metabolism in the guinea-pig. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 272, 46 (1972)

453. Vollmer, J., H. Wissler, G.G. Belz: Hemmwirkung von Herzglykosiden auf die ^{86}Rb -Aufnahme der Erythrozyten. II. Spezifität der Hemmwirkung unter besonderer Berücksichtigung der Cymarin-Reihe. *Europ. J. clin. Pharmacol.* 4, 99 (1972)
454. Wagner, J.G., M. Christensen, E. Sakmar, D. Blair, J.D. Yates, P.W. Willis, A.J. Sedman, R.G. Stoll: Equivalent lack in digoxin plasma levels. *JAMA* 224, 199 (1973)
455. Warren, M.C., R.E. Gianelly, S.L. Cutler, D.C. Harrison: Digitalis toxicity II. The effect of metabolic alkalosis. *Am. Heart J.* 75, 358 (1968)
456. Wartburg, von A.V., F. Kalberer, I. Rutschmann: Tritium-labeled cardiac glycosides: Digoxin ($12\text{ }^3\text{H}$). *Biochem. Pharmacol.* 14, 1883 (1965)
457. Waser, P.G.: Über den Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden. *Schweiz. med. Wschr.* 92, 819 (1962)
458. Watson, E., S.M. Kalman: Assay of digoxin in plasma by gas chromatography. *J. of Chromatogr.* 56, 209 (1971)
459. Watson, E., P. Tramell, S.M. Kalman: Identification of submicrogram amounts of digoxin, digitoxin, and their metabolic products. *J. Chromatog.* 69, 157 (1972)
460. Watson, E., D.R. Clark, S.M. Kalman: Identification by gas chromatography mass spectroscopy of dihydrodigoxin - a metabolite of digoxin in man. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 184/2, 424 (1973)
461. Weese, H.: Digitalis, Leipzig 1936
462. Weissler, A.M., J.R. Synder, C.D. Schoenfeld, S. Cohen: Assay of digitalis glycosides in man. *Am. J. Cardiol.* 17, 768 (1966)
463. Weissler, A.M., W.S. Harris, C.D. Schoenfeld: Systolic time intervals in heart failure in man. *Circulation* 37, 149 (1968)
464. Weissler, A.M., C.D. Schoenfeld: Effect of digitalis on systolic time intervals in heart failure. *Am. J. Med. Sci.* 259, 4 (1970)
465. White, R.J., D.A. Chamberlain, M. Howard, T.W. Smith: Measurement of plasma digoxin by radioimmunoassay. *Proc. Roy. Soc. Med.* 63, 703 (1970)
466. White, R.J., D.A. Chamberlain, M. Howard, T.W. Smith: Plasma concentrations of digoxin after oral administration in the fasting and postprandial state. *Brit. Med. J.* 1, 380 (1971)

467. Whiting, B., J.C. Rodger, D.J. Summer: New formulation of digoxin. Lancet II, 922 (1972)
468. Williams, J.F., D.L. Boyd, J.F. Border: Effect of acute hypoxia and hypercapnic acidosis on the development of acetylstrophanthidin - induced arrhythmias. J. Clin. Invest. 47, 1885 (1968)
469. Wilzbach, K.E.: Tritiumlabeling by exposure of organic compounds of tritiumgas. J. Amer. Chem. Soc. 79, 1013 (1957)
470. Wirth, K., G. Bodem, H.J. Dengler: Resorption, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digoxin und digoxinverwandten Verbindungen. In: Aktuelle Digitalisprobleme. Herausgeber: R. Schröder und K. Greeff. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1972
471. Withering, W.: An account of the foxglove and some of its medical uses, with practical remarks on dropsy and other diseases. M. Swiney, Burmingham 1785
472. Wright, S.E.: The metabolism of cardiac glycosides. Charles C. Thomas, Springfield/Ill., 1960
473. Yalow, R.S., S.A. Berson: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184, 1648 (1959)
474. Yalow, R.S., S.A. Berson: Immunoassay of plasma insulin. Meth. biochem. Qual. 12, 69 (1964)
475. Yeh, B.K., P.K. Sung, A.K. Saha: Use of potassium canrenoate to suppress ouabain-induced ventricular arrhythmias in dogs. Circulation Res. 31, 915 (1972)
476. Yoda, A.: Structure-activity relationship of cardiotonic steroids for the inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosinetriphosphatase. 1. Dissociation rate constants of various enzyme-cardiac glycoside complexes formed in the presence of magnesium and phosphate. Molec. Pharmacol. 9, 51 (1973)
477. Zeegers, J.J.W., J.H.J. Maas, A.F. Willebrands, H.H. Kruyswijk, G. Jambroes: The radioimmunoassay of digoxin. Clin. Chem. Acta 44, 109 (1973)
478. Zorbach, W., G. Pietsch: Teilsynthese der anomeren 2-Desoxy-Glycopyranoside des Digitoxingenins. Ann. 655, 25 (1962)
479. Zorbach, W., S. Saeki, W. Bühler: Strophanthidin cardenolides containing hexoses of the mannose series. J. Med. Chem. 6, 298 (1963)

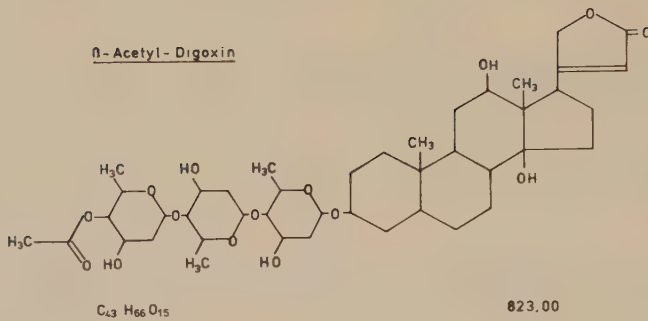


Abb. I: Struktur- und Summenformel sowie Molekulargewicht von β -Acetyldigoxin.

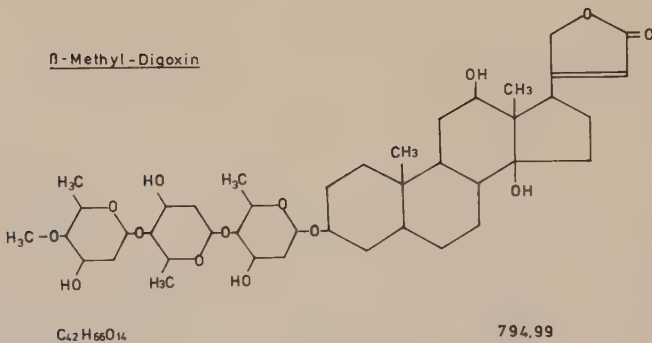
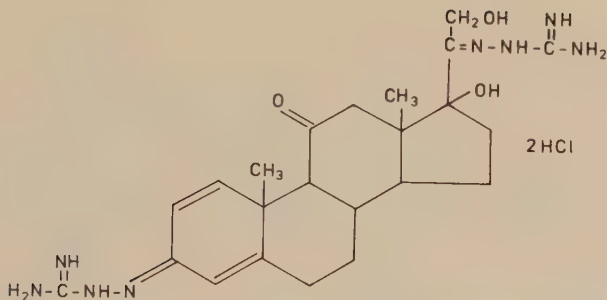


Abb. II: Struktur- und Summenformel sowie Molekulargewicht von β -Methyldigoxin.

Prednison-3,20-bis-guanyldiazon-
-dihydrochlorid



$C_{23}H_{34}N_8O_3 \cdot 2HCl$

543,50

Abb. III: Struktur- und Summenformel sowie Molekulargewicht
eines Vertreters der Bisguanyldiazone (BGH).

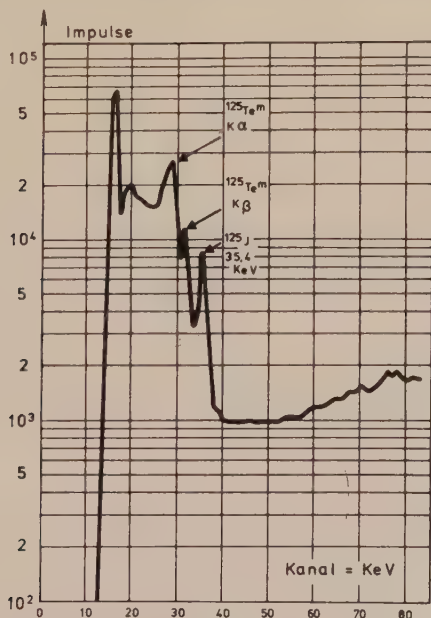


Abb. IV: Energiespektrum von ^{125}J mit dem charakteristischen Peak von 35,4 keV und den beiden Röntgenlinien $k\alpha$ und $k\beta$ des intermediären Zerfallsproduktes ^{125m}Te , aufgenommen mit einem hochauflösenden Li(Ge)-Detektor im Institut für Kernchemie der Universität Mainz. (Mit freundlicher Überlassung der Fa. Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach-Steinberg.)

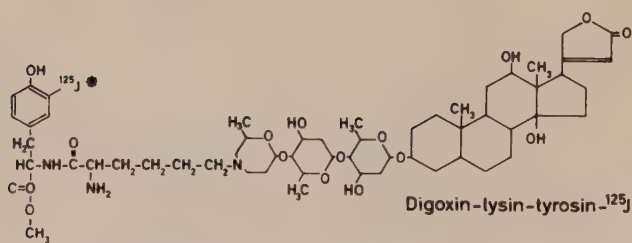
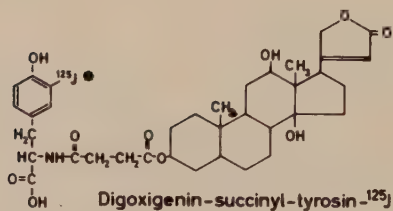
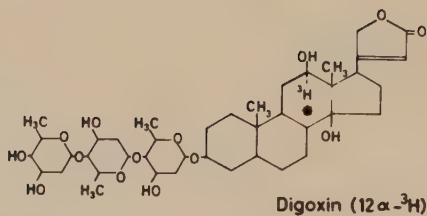


Abb. V: Strukturformeln von selektiver ^3H - und ^{125}J -Markierung am Digoxin- bzw. Digoxigeninmolekül.

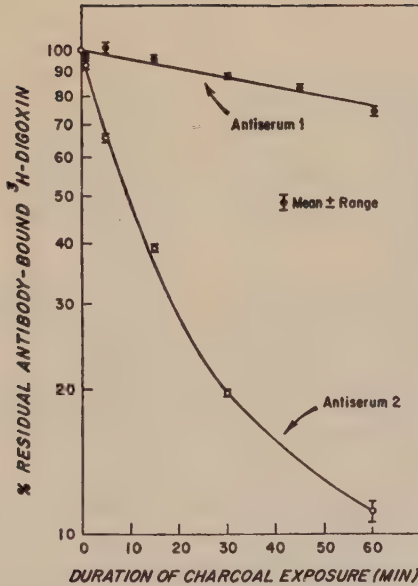


Abb. VI: 2 Digoxin-Antiseren mit verschiedenen Dissoziationskonstanten, erkennbar bei der Charcoal-Separation. Antiserum 1 hat eine größere Affinität zum Antigen und damit eine kleinere Dissoziationskonstante; die Digoxinbestimmung wird so weniger beeinflusst durch verschieden lange Charcoal-Inkubationszeiten - dagegen konträr sind die Verhältnisse beim Antiserum 2.
(Entnommen: Smith, T.W. (400)).

Prinzip	Trennmethode
Unterschiedliche Wanderung von freiem und gebundenem Tracer	Elektrophorese Chromatographie Chromatoelektrophorese Gelfiltration
Isolierung des freien Tracers	Adsorption an Dextran-Charcoal (188, 270, 334) Adsorption an Talkum und Silikaten Ionenaustausch
Isolierung des Antigen-Antikörperkomplexes	Fraktionierung mit organischem Lösungsmittel Salzpräzipitation (128, 319) Präzipitation mit Dioxan Präzipitation mit Polyäthylenglykoll (11) Immunradiometrie Immunosorption Solid-phase (252, 331)

Tab. I: Verschiedene Methoden zur Trennung des ungebundenen Tracers vom Antigen-Antikörper-Komplex.

Tab. II: Vergleichende Digoxinkonzentrationsbestimmungen von 186 Patientenseren mit 5 verschiedenen kommerziellen RIA.

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
1	2,10 1,45	2,50 1,90	1,20 1,10	1,30 1,10	1,33 0,91
2	2,10 1,50	2,36 2,18	0,50 0,20	0,85 1,00	1,40 0,89
3	1,50 1,76	0,50 1,94	0,50 0,70	1,00 1,40	1,15 0,81
4	1,56 1,76	1,48 1,63	0,80 0,80	0,90 1,30	0,71 0,99
5	0,98 1,10	0,33 0,68	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 0,00
6	1,82 2,00	1,58 1,72	1,10 1,27	0,85 1,00	0,00 0,30
7	2,10 2,10	1,88 2,10	1,00 1,40	1,30 1,80	1,25 1,50
8	2,73 2,80	2,36 3,50	1,10 1,40	1,30 1,70	1,92 2,25
9	3,20 3,40	3,40 3,80	1,60 1,70	1,30 1,70	1,75 1,90
10	0,58 0,61	0,52 0,78	0,00 0,40	0,00 0,20	0,00 0,20
11	1,00 1,52	1,18 1,34	0,40 0,80	0,70 0,80	0,55 0,69
12	2,10 2,44	2,64 2,68	1,20 1,40	1,30 1,70	1,29 1,50
13	1,22 1,38	0,88 1,04	0,38 0,40	0,50 0,80	0,30 0,60
14	2,10 2,40	2,20 2,28	0,80 1,10	1,00 1,30	1,05 1,20
15	1,90 2,64	1,78 1,94	0,60 1,10	0,90 1,40	0,95 0,92
16	2,58 2,82	2,10 2,50	1,27 1,40	1,10 1,30	1,15 1,30
17	1,58 1,60	1,48 1,75	0,10 0,30	0,20 0,80	0,72 1,00
18	3,10 3,48	1,67 1,95	1,40 1,80	1,10 1,40	0,85 1,00
19	3,02 3,28	2,54 3,14	0,50 0,80	1,10 1,10	0,99 1,25
20	2,44 2,79	2,15 2,66	1,10 1,20	0,90 1,30	0,95 1,10
21	0,85 0,98	1,04 1,28	0,10 0,40	0,60 1,00	0,30 0,42
22	0,50 0,60	0,40 0,65	0,20 0,20	0,30 0,90	0,02 0,14

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
23	1,98 2,00	2,04 2,33	1,65 1,78	0,85 1,10	0,55 0,77
24	3,05 3,20	1,58 1,76	0,80 1,00	1,40 1,90	1,15 1,19
25	2,25 2,40	2,84 3,54	1,50 1,80	1,25 1,40	1,19 1,48
26	1,45 1,80	0,95 1,05	0,60 0,60	0,70 0,80	0,53 0,61
27	0,92 0,95	1,20 1,38	0,90 1,00	0,70 0,80	0,34 0,45
28	1,44 1,66	1,46 1,60	0,80 1,00	0,80 1,10	0,70 0,91
29	0,30 0,30	0,95 1,04	0,83 0,90	1,00 1,10	0,90 0,95
30	2,10 2,44	2,88 3,18	2,80 2,90	2,30 3,80	1,52 1,60
31	0,65 0,65	0,74 0,98	0,40 0,50	0,70 1,00	0,39 0,60
32	1,75 2,64	1,76 1,94	1,10 1,20	1,10 1,30	0,99 1,21
33	3,74 3,80	3,22 3,52	1,10 1,10	1,30 1,40	1,38 1,55
34	1,90 2,00	1,58 1,72	0,90 1,00	1,10 1,50	0,98 1,30
35	1,65 1,88	1,44 1,68	0,80 0,90	1,10 1,20	0,80 0,99
36	0,44 0,60	1,35 1,60	0,80 0,94	1,00 1,20	0,97 1,10
37	0,25 0,50	0,26 0,48	0,00 0,20	0,10 0,40	0,05 0,09
38	0,55 0,68	1,22 1,48	0,50 0,60	0,50 0,90	0,58 0,84
39	0,62 0,93	1,76 1,90	0,75 0,94	0,11 0,20	1,04 1,20
40	1,00 1,25	0,78 0,90	0,20 0,40	0,30 0,45	0,48 0,69
41	1,45 1,95	1,24 1,50	0,60 0,70	0,80 1,20	0,68 0,92
42	0,80 1,05	1,34 1,50	0,60 0,80	0,70 0,90	0,69 0,92
43	0,60 1,00	0,30 1,04	0,70 0,70	0,70 0,80	0,55 0,75
44	0,30 0,84	0,84 1,00	0,10 0,30	0,30 0,50	0,42 0,55

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
45	1,10	1,34	0,26	1,44	0,52
46	0,85	1,34	1,45	1,60	0,65
47	0,15	0,32	0,56	0,65	0,10
48	0,60	0,84	0,98	1,05	0,46
49	0,48	0,50	0,58	0,75	0,21
50	0,15	0,35	0,20	0,40	0,00
51	0,65	0,72	0,96	1,00	0,68
52	2,14	2,25	2,18	2,42	0,95
53	0,95	1,00	0,68	0,95	0,13
54	1,24	1,52	0,68	0,88	0,48
55	2,54	2,65	2,04	2,78	1,10
56	2,48	2,78	2,54	2,92	1,02
57	0,65	1,10	0,44	0,78	0,07
58	1,15	1,22	0,92	1,25	0,30
59	1,56	1,78	1,08	1,24	0,56
60	1,05	1,70	0,92	1,10	0,58
61	2,15	2,20	1,58	1,80	0,80
62	2,28	2,36	1,60	2,44	0,97
63	1,53	1,78	1,24	1,88	0,68
64	1,70	1,85	1,35	1,70	0,96
65	1,85	1,97	0,95	1,10	0,78
66	1,95	2,35	1,24	1,47	0,85

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
67	2,55 2,61	1,66 1,80	0,70 0,85	0,80 1,20	1,05 1,10
68	2,05 2,32	1,88 2,18	0,50 0,70	1,00 1,25	1,16 1,30
69	1,57 1,64	0,46 0,70	0,00 0,00	0,20 0,60	0,30 0,39
70	1,20 1,35	1,48 1,63	0,65 0,70	0,70 0,85	0,85 0,99
71	3,18 3,48	2,74 3,00	0,80 1,10	1,75 1,90	1,20 1,75
72	0,70 0,75	0,80 0,88	0,77 0,80	1,30 1,50	1,44 1,59
73	1,04 1,20	0,60 0,84	0,20 0,40	0,60 0,85	0,45 0,60
74	2,20 2,47	1,34 1,50	0,10 0,30	0,90 1,10	0,88 0,95
75	1,95 2,08	0,75 0,90	0,00 0,10	0,70 1,25	0,64 0,68
76	2,34 2,55	1,58 1,77	0,10 0,30	0,80 0,95	0,45 0,89
77	2,95 3,20	2,90 2,42	0,80 0,90	1,30 1,50	1,32 1,36
78	3,08 3,66	1,34 1,75	1,20 1,30	0,90 1,00	1,66 1,97
79	1,79 2,25	1,05 1,24	0,10 0,20	0,70 0,70	0,51 0,59
80	1,48 1,50	2,33 2,80	0,50 0,80	1,40 1,60	1,29 1,37
81	0,90 1,05	1,74 2,00	0,40 0,70	0,95 1,10	1,00 1,01
82	2,08 2,12	1,66 1,89	0,30 0,55	1,20 1,60	0,90 0,95
83	0,14 0,30	0,30 0,40	0,20 0,40	0,30 0,20	0,19 0,33
84	2,05 2,62	1,75 1,90	0,30 0,40	1,20 1,45	1,05 1,06
85	1,50 1,90	1,22 1,40	0,80 0,98	0,80 0,90	0,70 0,71
86	1,64 1,80	1,97 2,04	0,30 0,90	1,00 1,50	1,13 1,38
87	0,60 0,70	0,45 0,66	0,00 0,30	0,40 0,80	0,42 0,45
88	0,65 1,06	0,55 0,78	0,30 0,50	0,60 0,85	0,67 0,72

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
89	0,80	0,85	0,68	0,98	0,35
90	1,64	1,94	1,50	1,90	0,98
91	1,32	1,45	1,50	1,75	1,00
92	1,00	1,00	0,70	0,89	0,72
93	0,68	1,15	0,23	0,40	0,12
94	0,10	0,15	0,26	0,58	0,06
95	0,04	0,08	0,28	0,53	0,00
96	1,50	1,80	1,20	1,80	0,85
97	0,92	1,10	1,65	1,87	1,05
98	0,68	0,85	1,95	2,20	1,05
99	1,65	1,96	2,02	2,30	1,05
100	1,25	1,50	0,94	1,04	1,25
101	2,65	2,74	2,33	2,50	0,68
102	1,38	1,38	0,84	0,95	1,28
103	1,70	1,82	2,15	2,66	0,85
104	1,85	2,08	2,46	2,66	1,38
105	1,70	2,20	2,06	2,18	1,30
106	1,10	1,20	1,24	1,47	1,25
107	1,10	0,94	1,34	1,55	0,75
108	2,60	2,70	2,04	2,16	0,77
109	1,02	1,10	2,04	2,10	1,30
110	1,76	2,05	1,54	1,74	1,37
			0,70	1,00	1,16
			0,70	1,80	1,56

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
111	2,42	1,66	0,50	1,08	0,98
112	1,58	1,20	0,60	1,00	1,10
113	2,42	2,08	0,80	1,65	1,25
114	0,60	0,32	0,00	0,30	0,20
115	0,52	0,72	0,00	0,50	0,50
116	1,30	1,00	0,40	0,70	0,88
117	1,68	1,55	0,50	0,90	0,87
118	1,12	0,95	0,50	0,70	0,82
119	1,12	0,70	0,30	0,60	0,79
120	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00
121	1,38	1,55	1,10	1,10	0,98
122	1,08	0,56	0,60	0,55	0,67
123	0,90	0,70	0,45	0,40	0,53
124	0,62	0,66	0,20	0,60	0,55
125	1,16	1,10	0,80	0,85	0,92
126	0,16	0,22	0,00	0,30	0,29
127	1,06	1,18	0,30	0,60	0,60
128	0,88	0,88	0,40	0,50	0,50
129	1,46	1,35	0,50	0,70	1,02
130	0,90	0,85	0,40	0,50	0,70
131	1,20	1,24	0,60	0,50	0,90

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
132	0,40	0,75	0,14	0,08	0,02
133	1,32	0,96	0,62	1,06	0,85
134	0,33	0,36	0,27	0,22	0,15
135	0,56	0,72	1,35	0,96	0,49
136	0,24	0,33	0,40	0,72	0,11
137	0,80	0,92	0,20	0,74	0,10
138	0,76	0,80	0,85	1,02	0,58
139	0,48	0,35	0,25	0,44	0,70
140	0,32	0,22	0,35	0,22	0,40
141	1,94	1,44	1,46	1,77	0,12
142	0,32	0,32	0,30	0,55	0,78
143	1,02	1,46	0,84	0,74	0,36
144	0,90	0,82	0,70	0,50	0,58
145	0,75	0,80	1,22	1,03	0,54
146	0,85	1,16	1,10	0,98	0,81
147	1,40	1,28	1,06	1,48	0,61
148	0,90	1,10	1,38	1,18	1,18
149	0,86	0,84	0,56	0,94	0,83
150	1,25	1,08	0,29	0,16	0,59
151	0,76	0,70	1,42	0,58	0,05
152	0,40	0,20	0,70	0,55	0,83
153	0,82	0,72	0,98	1,28	0,45
			0,40	0,15	0,75
					0,80

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
154	0,88	0,50	0,10	0,20	0,90
155	0,05	0,03	0,00	0,00	0,19
156	0,88	0,56	0,00	0,05	0,41
157	2,02	1,64	1,00	0,75	1,60
158	1,30	1,42	0,65	0,70	1,90
159	0,24	0,18	0,00	0,15	0,00
160	0,92	0,80	0,80	0,24	0,82
161	1,22	1,78	0,95	1,15	1,00
162	1,59	1,68	0,50	0,60	0,35
163	1,97	2,00	0,50	0,90	0,80
164	1,14	1,35	0,77	1,05	1,00
165	1,24	1,45	0,30	0,40	0,40
166	1,05	1,34	0,22	0,40	0,60
167	2,05	2,16	2,30	2,55	2,40
168	1,44	1,64	0,40	0,65	0,70
169	2,56	2,86	0,80	1,00	1,20
170	1,90	2,10	0,90	1,35	1,90
171	1,38	1,55	1,10	1,12	0,58
172	0,80	1,00	0,85	1,10	0,90
173	1,40	1,50	0,65	0,70	1,10
174	1,35	1,75	1,70	1,85	1,20
					1,72
					1,92

Tab. II: (Fortsetzung)

Nr.	RIA (A1) (ng/ml)	RIA (A2) (ng/ml)	RIA (B1) (ng/ml)	RIA (B2) (ng/ml)	RIA (C) (ng/ml)
175	1,55 1,60	1,68 1,80	1,70 1,90	2,10 2,40	1,36 1,48
176	1,20 1,40	1,48 1,50	0,80 0,85	0,90 1,00	0,90 1,00
177	1,55 1,66	1,60 1,84	0,60 0,65	0,80 1,00	1,17 1,38
178	1,55 1,60	1,50 1,60	0,75 0,85	0,80 0,90	0,85 0,88
179	1,45 1,15	1,00 1,10	0,80 1,45	1,20 1,80	0,90 1,00
180	1,50 1,55	1,50 1,66	0,66 0,80	0,80 0,80	0,90 0,94
181	2,00 2,20	2,66 2,74	1,20 1,50	1,50 1,20	2,15 2,40
182	0,75 0,90	1,00 1,10	0,60 0,75	0,40 0,60	0,45 0,48
183	0,70 1,05	0,96 1,02	0,00 0,40	0,60 0,70	0,51 0,55
184	0,80 1,15	1,17 1,22	0,35 1,10	1,00 1,20	0,75 1,00
185	2,65 2,85	2,40 2,56	2,60 3,10	3,10 3,30	2,65 3,50
186	2,45 2,70	2,40 2,70	1,10 1,90	1,20 1,40	1,32 1,33

	RIA B ₂ ng/ml	L ₁ ng/ml	L ₂ ng/ml	Streu- breite	F ₁	F ₂
Mod. III	1,6	0,9	0,9	0,9-1,6	1,8	1,0
Mod. IV	2,2	2,5	1,5	1,5-2,5	1,7	1,7
Pat. 4	0,9	0,4	0,6	0,4-0,9	2,2	1,5
" 10	0,0	0,0	0,0	0,0-0,0	1,0	1,0
" 11	0,7	0,4	0,4	0,4-0,7	1,7	1,0
" 14	1,0	0,9	1,2	0,9-1,2	1,3	1,3
" 22	0,3	0,0	0,0	0,0-0,3	3,0	1,0
" 26	0,7	0,4	0,6	0,4-0,7	1,7	1,5
" 27	0,7	0,1	0,5	0,1-0,7	7,0	5,0
" 28	0,8	0,7	0,8	0,7-0,8	1,1	1,1
" 29	1,0	0,1	1,1	0,1-1,1	11,0	11,1
" 30	2,3	2,3	3,2	2,3-3,2	1,4	3,2
" 32	1,1	0,7	1,1	0,7-1,1	1,5	1,1
" 33	1,4	2,0	1,8	1,4-2,0	1,4	1,1
" 37	1,1	0,0	0,1	0,0-1,1	11,0	1,0
" 42	0,9	0,7	0,7	0,7-0,9	1,3	1,0
" 43	0,7	0,1	0,7	0,1-0,7	7,0	7,0
" 44	0,5	0,1	0,6	0,1-0,6	6,0	6,0
" 56	1,2	0,7	1,0	0,7-1,2	1,7	1,4
" 60	0,6	0,4	0,4	0,4-0,6	1,5	1,0
" 61	0,9	0,4	0,6	0,4-0,9	2,2	1,5
" 64	1,0	0,4	1,0	0,4-1,0	2,5	2,5
					2,8	2,0

Tab. III: Vergleichende radioimmunchemische Digoxinbestimmungen von 20 Patientenseren und 2 in vitro präparierten Modellseren durch 3 Labors im sogen. Ringversuch: unser Labor mit dem ¹²⁵J-RIA B₂, 2 Universitätslabors L₁ und L₂ in der BRD. Die Streubreiten zwischen allen 3 Labors variieren im Mittel um den Faktor (F₁) 2,8, zwischen den beiden auswärtigen Labors L₁ und L₂ um den Faktor (F₂) 2,0.

D a n k s a g u n g

Herrn Professor Dr.Dr.E.H.Graul, Ordinarius und Direktor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin in Marburg, danke ich bestens für die freundliche Überlassung des Themas und für wertvolle Anregungen bei der Darstellung der Untersuchungsergebnisse.

Herrn Dozenten Dr.H.Müller danke ich für Gespräche und Anregungen bei der Durchführung der Untersuchungen.

L e b e n s l a u f

Am 27.4.1925 wurde ich als Tochter des Ingenieurs Alexander Wachtel und seiner Ehefrau Irene, geborene Berger, in Berlin geboren. Nach Absolvierung von Volks- und Oberschule mit Abitur 1943 in derselben Stadt nahm ich 1946 an der Humboldt-Universität das Medizinstudium auf, das ich 1952 mit dem Staatsexamen abschloß. Nach 2-jähriger Medizinalassistentenzeit erhielt ich 1955 die Vollapprobation; danach trat ich die Facharztausbildung in innerer Medizin ebenfalls in Berlin an und erwarb 1960 nach bestandenem Kolloquium die Facharztanerkennung. Seither war ich ununterbrochen als Internistin in Kliniken in Berlin, Dortmund und Basel tätig.

Meine akademischen Lehrer in Berlin waren die Herren Professoren Anders, Th. Brugsch, J. Brugsch, Chomse, Destunis, Felix, Gasteiger, Hansen, Hennemann, Holstein, Hoffmann, Jung, Kettler, Klinke, Kopsch, Kraatz, Krautwald, Leiber, Linser, Linzbach, Löhlein, Lohmann, Madlener, Noack, Oesterle, Sauerbruch, Schäfer, Scheffnetten, Shopohl, F.H. Schulz, Schulz van Treeck, Stieve, Stöckel, Thiele, Vogel, Winter.

